

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude du rôle de l'épigénétique dans l'expression d'adipokines dans des adipocytes exposés au découplage mitochondrial

Sacré, Pierre

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DU ROLE DE L'EPIGENETIQUE DANS L'EXPRESSION D'ADIPOKINES
DANS DES ADIPOCYTES EXPOSES AU DECOUPLAGE MITOCHONDRIAL**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Pierre SACRE

Janvier 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Etude du rôle de l'épigénétique dans l'expression d'adipokines dans des adipocytes exposés au découplage mitochondrial

SACRE Pierre

Résumé

Chez les patients obèses et diabétiques de type II, le métabolisme gluco-lipidique du tissu adipeux blanc est dérégulé, favorisant la libre circulation des acides gras dans le sang, l'inflammation de « faible intensité » et l'installation de la résistance à l'insuline. La surcharge lipidique du tissu adipeux modifie également le profil d'expression des adipokines, molécules importantes de la communication inter-organes qui pourraient être responsables du syndrome métabolique. Le découplage mitochondrial, stratégie déjà proposée pour lutter contre l'obésité, conduit à une amélioration du métabolisme gluco-lipidique, à une diminution de la contenance en triglycérides et à un changement du profil d'expression de gènes codant pour les adipokines. Au sein du laboratoire URBC, le découplage mitochondrial modéré mais chronique est étudié sur des adipocytes blancs 3T3-L1 incubés en présence d'un protonophore, le FCCP.

Au cours de ce mémoire, nous avons montré qu'un découplage mitochondrial dans les adipocytes 3T3-L1 diminue l'expression de 4 adipokines (la leptine, la résistine, l'adiponectine et l'angiotensinogène) alors que l'expression de la thrombospondine-1, de l'apéline, du sérum amyloïde A1 et de la chémérine n'est que légèrement modifiée. Nous avons étudié la méthylation de l'ADN d'îlots CpG dans le promoteur de gènes codant pour la leptine et l'angiotensinogène et nous montrons que le découplage mitochondrial induit une augmentation de la méthylation de l'ADN dans le promoteur proximal de la leptine. Par contre, nous n'avons pas pu montrer de changement du taux global de méthylation de l'ADN de la région distale du promoteur de la leptine et de l'angiotensinogène. Nous avons ensuite tenté de caractériser l'enzyme responsable de cette augmentation de méthylation de l'ADN par 2 approches : le silençage de DNMTs et l'inhibition chimique de leur activité à l'aide d'inhibiteurs chimiques comme le 5-azacytidine et le SGI-1027. Les résultats de l'effet de l'inhibition des DNMTs sur l'expression des adipokines dans les adipocytes incubés en présence de FCCP suggèrent que ces enzymes ne seraient pas impliquées dans la diminution d'expression des adipokines observée dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Thierry ARNOULD

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon promoteur Monsieur Arnould. Sa rigueur et son dévouement pour la sciences m'ont permis de comprendre la complexité, la rigueur, la réflexion et le temps que nécessitent le travail de chercheur. Merci aussi pour le temps passé à corriger mon manuscrit ! Merci aussi à Mme Renard pour son encadrement en début de mémoire et ses conseils pertinents lors des réunions d'équipe. J'aimerais aussi remercier Stéphane Demine pour m'avoir encadré tout au long de ce mémoire. Ton expertise de biologiste m'a permis d'apprendre et de m'aguerrir à des techniques de culture et de biologie cellulaire. Ton suivi m'a également beaucoup aidé dans les moments d'incertitude, d'hésitation ou de confusion et je t'en suis très reconnaissant. Je salue également le temps que tu as consacré à m'expliquer les techniques, pour m'avoir épaulé lors de mes dernières manipulations ou encore à corriger mon manuscrit.

J'aimerais remercier également d'autres personnes du laboratoire URBC qui ont contribué de près ou de loin à mon épanouissement dans le laboratoire : Reddy, Silvia Tejerina, Marie, Vansteenbrugge, Morgane et tous les autres. J'ai très apprécié votre gentillesse et votre disponibilité. J'aimerais aussi remercier les techniciens du laboratoire pour leur disponibilité, en particulier Maude Fransolet.

Mon parcours scolaire est un peu atypique puisque j'ai débuté mes études supérieures à la Haute Ecole de la Province de Namur en agronomie, je m'en voudrais donc de ne pas remercier les personnes que j'ai côtoyées au cours de ces trois années et qui ont sans aucun doute joué un rôle dans ma volonté de poursuivre des études universitaires. J'aimerais ainsi remercier mon ancien professeur d'informatique Monsieur Coutonnier qui m'a encouragé dans mon désir de faire une année préparatoire et de continuer des études universitaires. J'aimerais aussi remercier le personnel du département R&D Enzymes de la société Puratos, en particulier Jean-Yves Deltour, Frédéric Roulling et Jacques Georis qui m'ont accueilli pour réaliser mon stage en 3^{ème} baccalauréat et m'ont encouragé dans la poursuite de mes études universitaires. Ce stage m'a véritablement donné l'envie d'approfondir mes connaissances en biochimie.

J'aimerais aussi remercier mes 2 collègues de bureaux Pierre Poncin (ou encore « *mon adjudant Poncin* ») et Claire Dording ainsi que les autres mémorants de l'URBC : Céline Warnon, Aurélie Beaurir et Dimitri Budinger. Les nombreux moments que j'ai passés en votre compagnie me laisseront de très bons souvenirs. J'aimerais remercier tous les mémorants pour m'avoir aidé à rendre à temps ce mémoire, un tout tout grand merci !

Pour terminer, j'aimerais évidemment remercier mes parents et mes sœurs, Elise et Laurence, pour m'avoir soutenu tout au long de mes études. C'est dans des moments de doutes mais aussi d'aboutissement comme celui-ci que je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir un entourage comme le mien. Etre à vos côtés me procure beaucoup de bonheur !

Liste des abréviations

A : Absorbance

ACC : Acetyl-Coenzyme A Carboxylase

ACL : ATP-Citrate Lyase

Acsl1 : Acyl coenzyme A synthetase long-chain family member 1

ADD1/SREBP1 : Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor 1/Sterol Regulatory Element-Binding Protein

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

ADNp : Acide désoxyribonucléique plasmidique

AgRP : Agouti-Related Protein

AID : Activation-Induced cytidine Deaminase

Amp : Ampicilline

AMPc : Adenosine Monophosphate cyclic

AMPK : 5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase

Ang : Angiotensine

AP-2 β : Activating Protein-2 beta

l'APPL1 : Adaptator Protein, Phosphotyrosine Interraction 1

ARN : Acide ribonucléique

ARN pol II : ARN polymerase II

AT1R et AT2R : Angiotensinogen Type 1 or 2 Receptor

ATCC : American Type Culture Collection

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase

BAM15 : (2-fluorophenyl){6-[(2-fluorophenyl)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pyrazin-5-yl)}amine

BCA : Bicinchoninic Acid

BER : Base Excision Repair

BMI : Body mass index

BMP2 et BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 2 et 4

BSA : Bovin Serum Albumin

CCCP : Carbonyl Cyanide m-chlorophenyl hydrazone

CD36 : Cluster of Differentiation 36

C/EBP α : CCAAT-Enhancer Binding Protein Alpha

Ct : Cycle threshold

CtBP : C-terminal Binding Protein

CTCF : CCCTC-binding Factor

DHG-L1 : Dubelco modified Eagle's medium high glucose

DIO2 : type II Iodothyronine Deiodinase

DLA : DIGE labelling buffer

DNMT : DNA methyltransferase

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DTT : Dithiothréitol

ϵ : Coefficient d'extinction molaire
 E47 : E-protein 47
 EHMT1 : Euchromatic Histone-lysine N-Methyltransferase1
 ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
 FABP4 : Fatty Acid Binding Protein 4
 FAD⁺ : Flavin Adenine Dinucleotide
 FAS : Fatty Acid Synthase
 FCCP : carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
 FOSL2 : Fos-related antigen 2
 GATA : GATA binding protein
 G6Pase : Glucose 6 Phosphatase
 GLUT4 : Glucose transporter type 4
 GMPc : Guanosine Monophosphate cyclic
 GTG : Gold Thioglucose
 HATs : Histones Acetyltransferases
 HDACs : Histones Deacetylases
 HDL : High density lipoprotein
 HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
 HMETs : Histones Methyltransferases
 HP1 : Heterochromatin protein 1
 HRP : Horseradish Peroxydase
 HSL : Hormone Sensitive Lipase
 Id3 : Inhibitor of differentiation 3
 IL : Interleukine
 IPTG : Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside
 JAK : Janus Kinase
 JMJs : Jumonji class
 JNK : c-Jun NH2-terminal Kinase
 KLF4 : Krüppel-Like Factor 4
 LB : Luria Bertani
 LCAD : Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
 LEP : Leptine
 Lpl : Lipoprotein Lipase
 LSD1 : Lysine Specific Demethylase 1
 M : Molaire
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MBD : Methyl Binding Domain
 MGL : Monoglyceride Lipase
 MPT : Modification post-traductionnelle
 Myf5 : Myogenic factor 5
 NAMPT : Nicotinamide Phosphorybosyltransférase
 NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell
 NF-kB : Nuclear Factor-kappa B
 NF-Y : Nuclear Factor-Y

NMNT : *Nicotinamide N-Methyltransférase*
 NO : *Nitric Oxide*
 OMS : *Organisation mondiale de la santé*
 OXPHOS : *Oxidative phosphorylation*
 PAX7⁺ : *Paired-box 7*
 PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
 PBS : *Phosphate Buffer Saline*
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*
 PDGFR- α^+ : *alpha-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
 PEPCK : *Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase*
 PIB : *Phosphatase Inhibitor Buffer*
 PIC : *Protease Inhibitor Cocktail*
 PKB (ou Akt) : *Protein Kinase B*
 Plin1 : *Perilipin1*
 PolyHis : *Polyhistidine*
 POMC : *Pro-opiomélanocortine*
 PPAR γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma*
 PRDM16 : *PR Domain zinc finger protein 16*
 RBP4 : *Retinol Binding Protein 4*
 RT-PCR : *Reverse transcriptase PCR*
 SAA : *Serum amyloïd A*
 SAH : *S-adénosylhomocystéine*
 SAM : *S-adénosylméthionine*
 siNTP : *Non Targeting Pool*
 siRNA : *short interferent RNA*
 SIRT6 : *Sirtuines*
 SOCS3 : *Suppressor Of Cytokine Signaling 3*
 Sp1 : *Specificity Protein 1*
 SRE : *Sterol Regulatory Element*
 SREBP1c : *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*
 STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*
 TA : *Température ambiante*
 Taq : *Thermococcus aquaticus*
 TBP : *TATA-box Binding Protein*
 TDG : *Thymine DNA Glycosylase*
 TET : *Ten Eleven Translocation*
 TF : *Transcription Factor*
 TFIID : *Transcription Factor II D*
 TG/TAG : *Triglycéride/Triacylglyclérol*
 TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
 TSP-1 : *Thrombospondine-1*
 TSS : *Transcription start site*
 TZD : *Thiazolidinedione*
 UCP-1 : *Uncoupling Protein-1*

UHRF1 : *Ubiquitin-like plant Homeodomain and RING Finger domain 1*

UK : *United Kingdom*

UV : *Ultraviolet*

X-Gal : *5-bromo-4-3-indolyl- β -D-galactopyranoside*

ZFP423 : *Zinc-Finger Protein 423*

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Obésité et syndrome métabolique	1
1.2	Pathophysiologie de l'obésité.....	1
1.3	L'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type II.....	2
1.4	Les tissus adipeux.....	3
1.4.1	Tissu adipeux blanc.....	3
1.5	Adipogenèse et différenciation des adipocytes blancs	11
1.6	Tissu adipeux brun	13
1.6.1	Localisation et morphologie.....	13
1.6.2	Fonctions métaboliques.....	13
1.6.3	Adipogenèse des adipocytes bruns.....	14
1.7	Tissu adipeux beige	14
1.7.1	Localisation et morphologie.....	14
1.7.2	Fonctions métaboliques.....	15
1.7.3	Adipogenèse.....	15
1.8	Traitements contre l'obésité	16
1.8.1	Découplage mitochondrial dans les adipocytes du tissu adipeux blanc.....	16
1.9	Epigénétique.....	18
1.9.1	Mécanismes moléculaires contrôlant la transcription	18
1.9.2	Mécanisme épigénétique et remodelage de la chromatine.....	19
1.10	Influence du métabolisme sur l'épigénétique.....	23
2	Objectifs du mémoire	25
3	Matériel et méthodes	26
3.1	Culture et différenciation des 3T3-L1	26
3.1.1	Repiquage.....	26
3.1.2	Différenciation des pré-adipocytes en adipocytes.....	26

3.1.3	Traitement avec le TNF α ou le FCCP	26
3.2	Analyse de l'expression génique.....	26
3.2.1	Extraction et purification de l'ARNm	26
3.2.2	Dosage de la concentration en ARN	27
3.2.3	Reverse transcription-PCR (RT-PCR)	27
3.2.4	PCR quantitative en temps réel	28
3.2.5	Analyse des résultats	28
3.3	Analyse du taux de méthylation de fragments d'ADN par traitement au bisulfite ..	28
3.3.1	Principe.....	28
3.3.2	Matériel et méthodes	29
3.4	Silencage de l'expression des DNMTs par siRNA	32
3.4.1	Principe.....	32
3.4.2	Coating des plaques 6 puits	33
3.4.3	Resuspension des cellules	33
3.4.4	Electroporation et silencage	33
3.4.5	Traitement post-électroporation	33
3.5	Analyse de l'abondance protéique par Western blotting.....	33
3.5.1	Préparation des extraits nucléaires	33
3.5.2	Dosage des protéines nucléaires par la méthode du réactif de Pierce 660 nm	34
3.5.3	Préparation des échantillons.....	34
3.5.4	Préparation du gel NuPage et chargement des échantillons.....	34
3.5.5	Transfert semi-sec des protéines sur une membrane PVDF	35
3.5.6	Blocage de la membrane	35
3.5.7	Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires	35
3.5.8	Révélation et quantification	35
3.6	Dosage des activités enzymatiques DNMTs	36
3.6.1	Principe.....	36

3.6.2	Préparation des échantillons.....	36
3.6.3	Préparation de la courbe standard	36
3.6.4	Dosage des activités DNMTs.....	36
3.7	Dosage des activités TETs	37
3.7.1	Principe.....	37
3.7.2	Préparation des échantillons.....	37
3.7.3	Préparation de la courbe standard de l'activité des TETs.....	37
3.7.4	Dosage de l'activité des enzymes TETs.....	37
3.8	Analyse statistique.....	38
4	Résultats et discussion.....	39
4.1	Effet du découplage mitochondrial sur l'expression d'adipokines	39
4.2	Effet du découplage mitochondrial sur l'activité enzymatique des DNMTs et des HDACs.....	43
4.3	Effet du découplage mitochondrial sur l'abondance relative du transcrit des DNMTs	44
4.4	Effet du découplage mitochondrial sur l'abondance protéique des DNMTs et des TETs	45
4.5	Effet du découplage mitochondrial sur la méthylation de l'ADN	45
4.5.1	Ilot CpG de la région proximale du promoteur de la leptine	46
4.5.2	Ilot CpG de la région distale du promoteur de la leptine	47
4.5.3	Ilot CpG de la région distale du promoteur de l'Agt.....	48
4.6	Silencage des DNMTs.....	49
4.6.1	Optimisation de la concentration en siRNA dirigés contre DNMT1 et DNMT3a... ..	49
4.6.2	Effet du silencage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'abondance protéique de DNMT1 et DNMT3a.....	50
4.6.3	Effet du silencage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'expression des adipokines (leptine, adiponectine, angiotensinogène et résistine) par des adipocytes incubés en présence de FCCP	50

4.6.4	Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'activité enzymatique des DNMTs dans des adipocytes incubés en présence de FCCP	53
4.6.5	Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur la méthylation de l'ADN par des adipocytes incubés en présence de FCCP	53
4.7	Effet d'inhibiteurs chimiques de DNMTs sur l'expression des adipokines	54
4.7.1	Effet de la 5-azacytidine ou du SGI-1027 sur l'abondance des transcrits.....	54
5	Conclusion et perspectives	57
6	Bibliographie	63

1 Introduction

1.1 Obésité et syndrome métabolique

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'obésité comme « *une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé* ». Le surpoids et l'obésité peuvent être évalués, par exemple, en mesurant l'indice de masse corporelle (BMI : body mass index). Un individu présentant un BMI ≥ 30 kg/m² est considéré comme obèse (Maury et Brichard, 2010) alors que la surcharge pondérale est définie par un BMI compris entre 25 et 30. L'obésité est souvent associée à l'absorption d'une quantité d'énergie qui excède les dépenses énergétiques et est fréquemment associée à diverses complications pathologiques telles que l'hypertension, la résistance à l'insuline, le diabète de type II, la dyslipidémie ainsi qu'une faible concentration plasmatique en HDL (*High Density Lipoprotein*)-cholestérol souvent regroupées sous le terme de « syndrome métabolique » (Guilherme et al., 2008).

L'obésité et les maladies métaboliques associées constituent un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. En Europe, entre 10 et 30 % des individus adultes sont obèses et plus de 24 % des enfants âgés entre 6 et 9 ans sont en surpoids ou obèses (Balkau et al., 2002; European Commission, 2010). Aux Etats-Unis, un tiers des personnes de plus de 20 ans est obèse (Flegal et al., 2010). En ce qui concerne les pays en voie de développement, le surpoids et l'obésité augmentent de 0,7 % annuellement (Popkin et al., 2012). Considéré comme une conséquence de l'obésité, le diabète de type II est en pleine expansion au point que le nombre de patients pourrait avoisiner les 350 millions en 2030 (Horgan and Stubbs, 2003). Au-delà de l'aspect purement sanitaire, l'obésité engendre également un problème économique non négligeable puisque, dans les 20 prochaines années, les coûts de soin de santé attribuables à l'obésité devraient représenter environ 16 % des dépenses totales en la matière dans les pays occidentaux (Wang et al., 2008), soit pour la Belgique environ 4 millions d'euros (source SPF Sécurité Sociale, INAMI).

1.2 Pathophysiologie de l'obésité

La sensibilité à l'obésité est associée à différents facteurs tels que le « background » génétique de l'individu (origine mono- mais surtout poly-génique dans l'espèce humaine) (Hinney et al., 2010), des facteurs environnementaux comme la malnutrition et la sous alimentation *in utero* (Remacle et al., 2011), à une perturbation du microbiome intestinal (Cani et al., 2007) ou encore à des infections virales comme l'adénovirus humain AD36 (Lin et al., 2013). Parmi les facteurs environnementaux qui peuvent contribuer au développement de l'obésité et à ses maladies associées, on peut citer que, chez les rongeurs, le régime du géniteur mâle, qu'il soit riche en graisses ou pauvre en protéines (Carone et al., 2010), conduit à un gain de poids et le développement du diabète de type II chez les descendants résultant d'une reprogrammation épigénétique appelée « transgénérationnelle ». Enfin, l'interaction fonctionnelle entre le microbiome intestinal et le métabolisme de l'hôte dans le contexte du développement de l'obésité, constitue actuellement un domaine de recherche très actif (Cani, 2014) depuis l'observation d'une modification du microbiote intestinal chez des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) (Ley et al., 2005; Zhang et al., 1994). En effet, ce microbiote

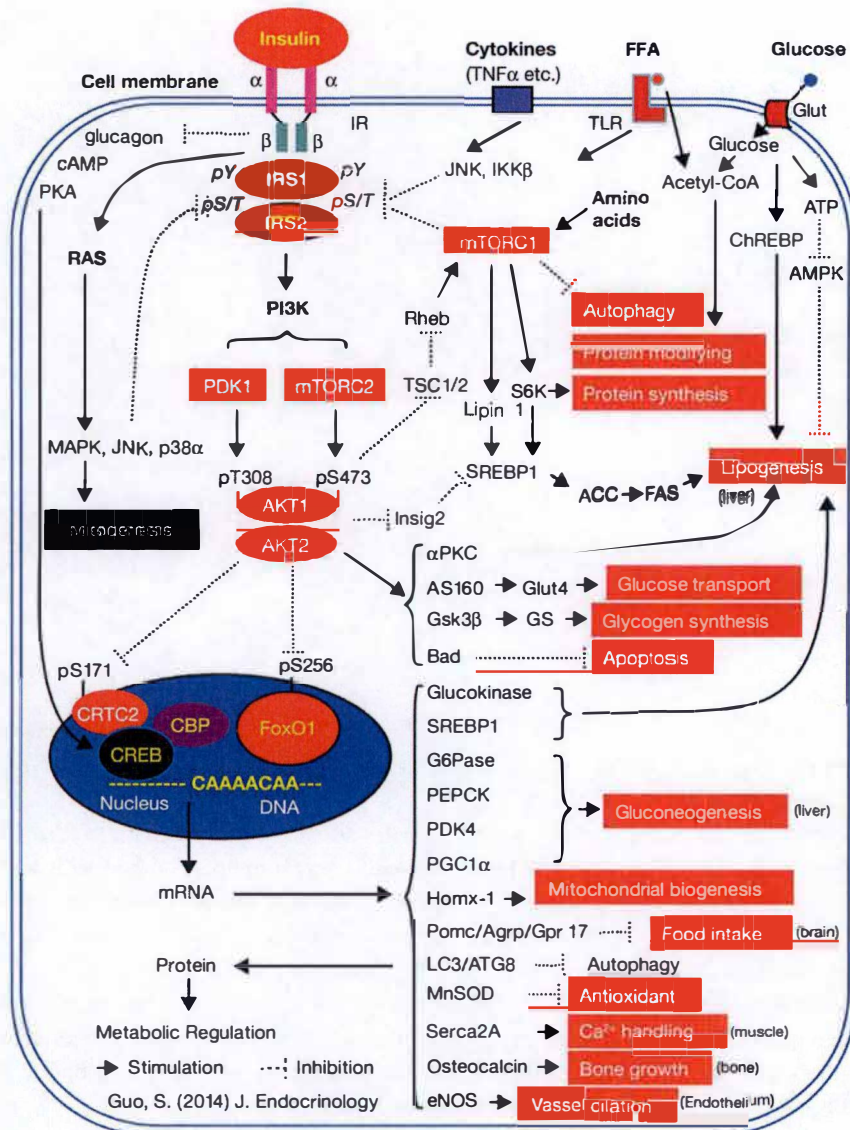


Figure 1 : La voie de signalisation de l'insuline et les interférences (Guo, 2014).

Lorsque l'insuline se lie à son récepteur, cela induit une transphosphorylation du récepteur à l'insuline. La voie de signalisation RAS/MAPK est dès lors activée pour favoriser la mitose et la croissance cellulaire.

La phosphorylation de résidus « tyrosine » du récepteur conduit au recrutement de plusieurs protéines incluant la PI3K. Cette activation de PI3k génère du phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, un second messager impliqué dans l'activation de PDK1, laquelle active, par phosphorylation, Akt. mTORC2 est également activée en réponse au second messager et phosphoryle la sérine 473 (S⁴⁷³) d'Akt. En inhibant Insig2, Akt induit l'expression et l'activation du facteur de transcription

SREBP1c, lequel régule la synthèse des lipides et du cholestérol via l'expression d'ACC suivi par l'activation de FAS. De plus, Akt inhibe le facteur de transcription FoxO1 (*forkhead transcription factor*), lequel régule positivement la gluconéogenèse dans le foie. Ainsi, mTORC2 et Akt médient l'effet suppressor de l'insuline sur la gluconéogenèse. Akt semble jouer un rôle central dans la signalisation de l'insuline puisqu'elle agit à différents niveaux. Ainsi, en levant l'effet inhibiteur de la GSK3 sur la GS, l'Akt favorise la synthèse de glycogène. Akt active également indirectement la RhebGTPase en inhibant la TSC2 résultant en une activation de mTORC1 dont la fonction la plus connue est d'inhiber l'autophagie, mettant en évidence le rôle de « prosurvie » de la cellule médié par l'insuline. mTORC peut également être activé par divers nutriments comme les acides aminés. Akt active également AS60, laquelle induit l'activation de la Rab10GTPase et la translocation de Glut4 favorisant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule. L'Akt médie également l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'apoptose. De plus, Akt phosphoryle et inhibe CRTC2, un co-activateur du facteur de transcription CREB résultant en une augmentation de la gluconéogenèse (hépatique). En régulant l'activité des facteurs de transcription SREBP1c et Foxo1, Akt contrôle enfin l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme. Plusieurs facteurs peuvent interférer avec la voie de signalisation de l'insuline. Le TNFα, retrouvé à plus forte concentration chez les individus obèses, mène à l'activation de JNK et IKKβ, des Ser/Thr kinases importantes dans l'installation de la résistance à l'insuline. Une hyperinsulinémie favorise également l'inactivation de l'IRS1 et l'IRS2 via la phosphorylation de sérine ou de thréonine par diverses kinases comme la p38α MAP kinase et JNK. De plus, mTOR peut médier l'ubiquitination de l'IRS1 et 2 favorisant ainsi leur dégradation.

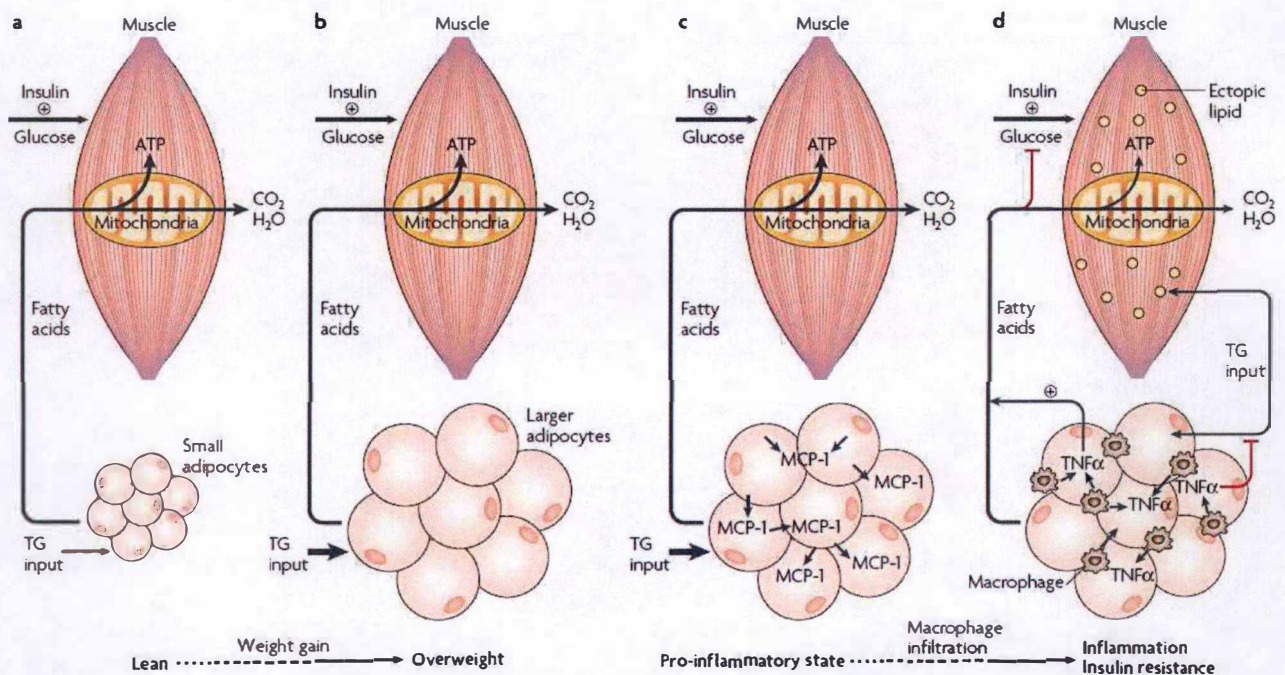


Figure 2 : Effet de l'expansion du tissu adipeux sur son état inflammatoire et sa communication avec le muscle strié squelettique (Guilherme et al., 2008).

a) Chez les individus minces, les triglycérides circulants sont absorbés par les adipocytes de petite taille et stockés sous la forme d'une gouttelette lipidique. Dans une situation de jeûne, les acides gras sont libérés par les adipocytes dans la circulation sanguine et sont pris en charge par les muscles squelettiques où ils seront oxydés pour former de l'ATP. L'insuline, quant à elle, stimule l'entrée de glucose dans les muscles squelettiques pour former de l'ATP via la glycolyse et le cycle de Krebs se terminant par la production d' H_2O et de CO_2 .

b) Chez les individus en surpoids mais non-diabétiques, l'augmentation de la concentration en triglycérides circulants est prise en charge par le tissu adipeux qui sert de « tampon » en vue d'éviter le stockage ectopique des triglycérides cause d'une diminution de la sensibilité à l'insuline. Durant le jeûne, les acides gras sont libérés par l'activation de la lipolyse et sont envoyés aux muscles squelettiques pour être catabolisés.

c) L'hypertrophie progressive des adipocytes est associée à une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), laquelle contribue au recrutement des macrophages et à la formation d'un environnement pro-inflammatoire.

d) En cas d'obésité, les adipocytes hypertrophiés associés à l'expansion du tissu adipeux sont insensibles à l'action anti-lipolytique de l'insuline. La présence de macrophages au sein du tissu adipeux, caractérisée par la sécrétion de TNF α , peut représenter jusqu'à 50 % de la population cellulaire du tissu contre seulement 10 % chez un individu mince. Le TNF α induit d'une part la libération d'acides gras et inhibe l'entrée d'acides gras dans les adipocytes. Ces acides gras libérés sont stockés de manière ectopique, y compris dans les muscles squelettiques où ils interfèrent avec la voie de signalisation de l'insuline et altèrent le transport intracellulaire du glucose. Il en résulte un état inflammatoire chronique mais léger au sein du tissu adipeux et un développement de la résistance à l'insuline.

TG : Triglycerides ; TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha; MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1.

est enrichi en Firmicutes et appauvri en Bacteroidetes par rapport aux souris sauvages (Ley et al., 2005). Une autre observation intéressante renforçant l'hypothèse de l'importance du microbiome dans le développement de l'obésité est l'induction d'un gain de poids chez une souris ayant subi un transfert du microbiote intestinal d'une souris obèse et ce, alors que l'animal reste isophagique (Turnbaugh et al., 2006). De nombreuses explications sont proposées pour tenter d'expliquer ces effets du microbiome comme une meilleure récupération énergétique suite à la fermentation de polysaccharides non digérés (Turnbaugh et al., 2009).

1.3 L'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type II

En réponse à un régime contenant des carbohydrates et des acides aminés, les cellules β du pancréas libèrent de l'insuline, une hormone anabolisante régulant, en partie, l'homéostasie gluco-lipidique suite à la mise en membrane plasmique de GLUT4, une isoforme du transporteur du glucose, par les cellules sensibles à l'insuline (Zisman et al., 2000). Les voies de signalisation conduisant à expliquer la réponse des cellules à l'insuline sont nombreuses (**Figure 1**). Ces voies sont importantes pour maintenir la glycémie qui doit rester comprise entre 5 et 10 mM pour satisfaire les demandes des organes les plus dépendants du glucose comme le cerveau (Guilherme et al., 2008).

Dans le cadre de l'obésité, la résistance à l'insuline conduit à une diminution de la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique et donc à une diminution du transport intracellulaire du glucose des cellules sensibles à l'insuline (muscles squelettiques, adipocytes, ...) (Abel et al., 2001; Gonzalez et McGraw, 2006). L'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline est à l'origine de la désensibilisation des cellules à répondre à la liaison de l'insuline à son récepteur. L'augmentation de la production de glucose hépatique témoigne également d'une altération de la sensibilité hépatique à l'insuline (Wu et al., 2010).

Ce premier stade de la résistance à l'insuline se traduit par une augmentation de la glycémie à jeun (Altomonte et al., 2003). En réponse à l'hyperglycémie, les cellules β sécrètent davantage d'insuline pour tenter de compenser la résistance à l'hormone. La progression de la résistance à l'insuline vers l'état diabétique est caractérisée par une diminution puis une suppression de la sécrétion de l'insuline suite à l'épuisement des cellules β -pancréatiques (Weir et al., 2001).

L'obésité résulte d'une hypertrophie et d'une hyperplasie conduisant à un état inflammatoire chronique léger caractérisé par le recrutement de macrophages et la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ résultant en un dysfonctionnement du tissu adipeux et des tissus périphériques comme les muscles squelettiques et le foie (Hotamisligil et al., 1995) (**Figure 2**). Au sein du tissu adipeux, une polarisation de la population de macrophages vers le type M1, pro-inflammatoire, au détriment du type M2, anti-inflammatoire, a été associée à la résistance à l'insuline et à la surnutrition (Lumeng et al., 2007). Cette polarisation représente une étape importante de l'instauration de l'inflammation chronique. L'accumulation de macrophages est précédée par le recrutement des cellules immunitaires adaptatives comme les lymphocytes T et B dans le tissu adipeux enflammé (Kintscher et al., 2008).

L'obésité étant caractérisée par un excès d'adiposité, la nature et les fonctions des tissus adipeux blancs, bruns et « beiges » sont présentées dans le paragraphe suivant.

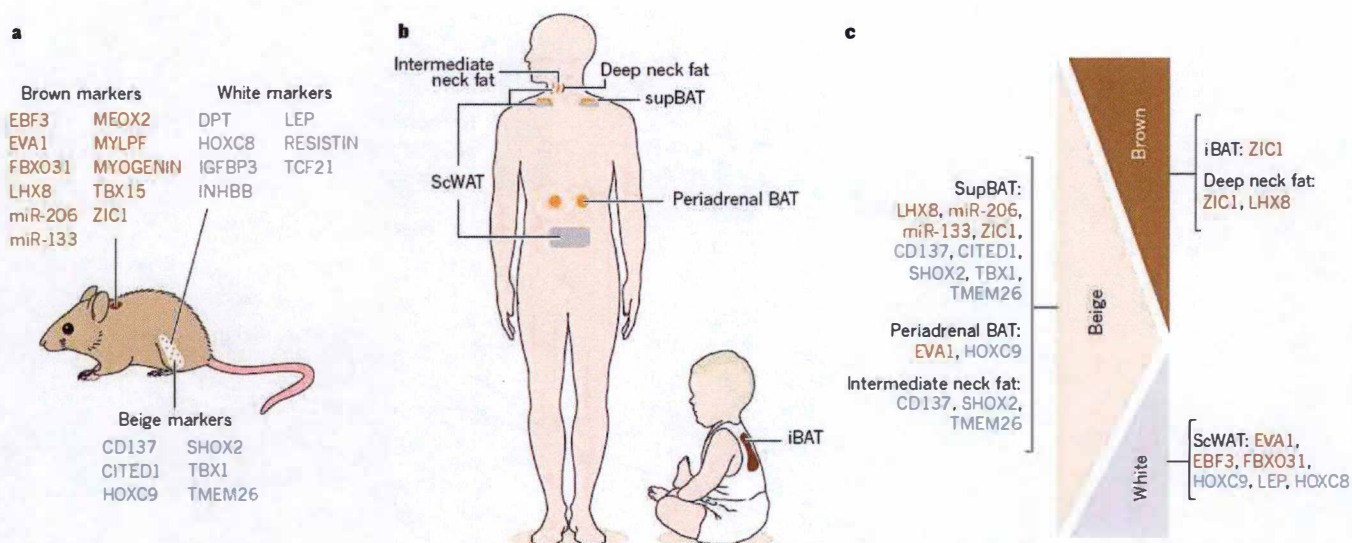


Figure 3 : Localisation des différents tissus adipeux et leurs marqueurs chez le rongeur, l'humain adulte et le nouveau-né (Peirce et al., 2014).

a) Les marqueurs moléculaires des différents types d'adipocytes (blanc, beige ou brun) chez le rongeur ont été identifiés au niveau de l'ARNm. Le tissu adipeux brun chez le rongeur est localisé au niveau de la région interscapulaire (en brun sur la figure). Les marqueurs du tissu adipeux brun (orange). Les marqueurs des adipocytes blancs et beiges sont localisés dans le tissu adipeux blanc sous-cutané (fond blanc avec points orange foncé), bien que les marqueurs spécifiques du beige soient identifiés uniquement après exposition au froid. Les marqueurs du tissu adipeux blanc sont colorés en gris alors que les marqueurs du tissu adipeux beige sont colorés en bleu ciel.

b) Distribution des différents types de dépôts adipeux chez l'homme : les adipocytes blancs, beiges et bruns sont colorés en gris, bleu ciel et brun, respectivement. Le tissu adipeux brun interscapulaire (iBAT) du nouveau-né (coloré en brun) est caractérisé par une forte expression d'un marqueur des adipocytes bruns des rongeurs, ZIC1, et par une faible expression d'un marqueur des adipocytes beiges des rongeurs, TBX1. Cette caractérisation moléculaire suggère que le tissu adipeux interscapulaire chez le nouveau-né est composé d'adipocytes bruns « typiques » ou « classiques » relatif à celui retrouvé chez les rongeurs. supBAT : *supraclavicular Brown Adipose Tissue* ; ScWAT : *subcutaneous White Adipose Tissue* ; iBAT, *interscapular Brown Adipose Tissue*.

c) Comparaison des marqueurs moléculaires de chaque type d'adipocytes des rongeurs qui ont été trouvés enrichis dans les différents dépôts adipeux chez l'humain. Le tissu adipeux brun supraclaviculaire (SupBAT), le tissu adipeux brun périadrénal (periadrenal BAT) et le dépôt graisseux intermédiaire de la nuque sont assimilés à du tissu adipeux beige chez l'humain adulte, contrairement au dépôt adipeux profond de la nuque considéré comme du brun classique (coloré en brun) au même titre que le tissu adipeux brun interscapulaire chez le nouveau-né.

EBF3 : *Early B Cell Factor 3* ; EVA1 : *Epithelial V-like antigen 1* ; FBXO31 : *F-Box Protein 31* ; LHX8 : *LIM Homeobox Protein 8* ; MEOX2 : *Mesenchyme Homeobox 2* ; MYLPF : *Myosin Light Chain, Phosphorytable, Fast Skeletal Muscle* ; TBX15 : *T-Box 15* ; ZIC1 : *Zinc Finger Protein of the Cerebellum 1* ; DPT : *Dermatopontin* ; HOXC8 : *Homeobox C8* ; IGFBP3 : *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3* ; INHBB : *inhibin beta-B* ; LEP : *Leptine* ; TCF21 : *Transcription Factor 21* ; CD137 : *CD137 antigen* ; CITED1 : *Cbp/p300-Interacting Transactivator with Glu/Asp-rich Carboxy-Terminal Domain 1* ; HOXC9 : *Homeobox C9* ; SHOX2 : *Short Stature Homeobox 2* ; TBX1 : *T-Box 1* ; TMEM26 : *Transmembran Protein 26*.

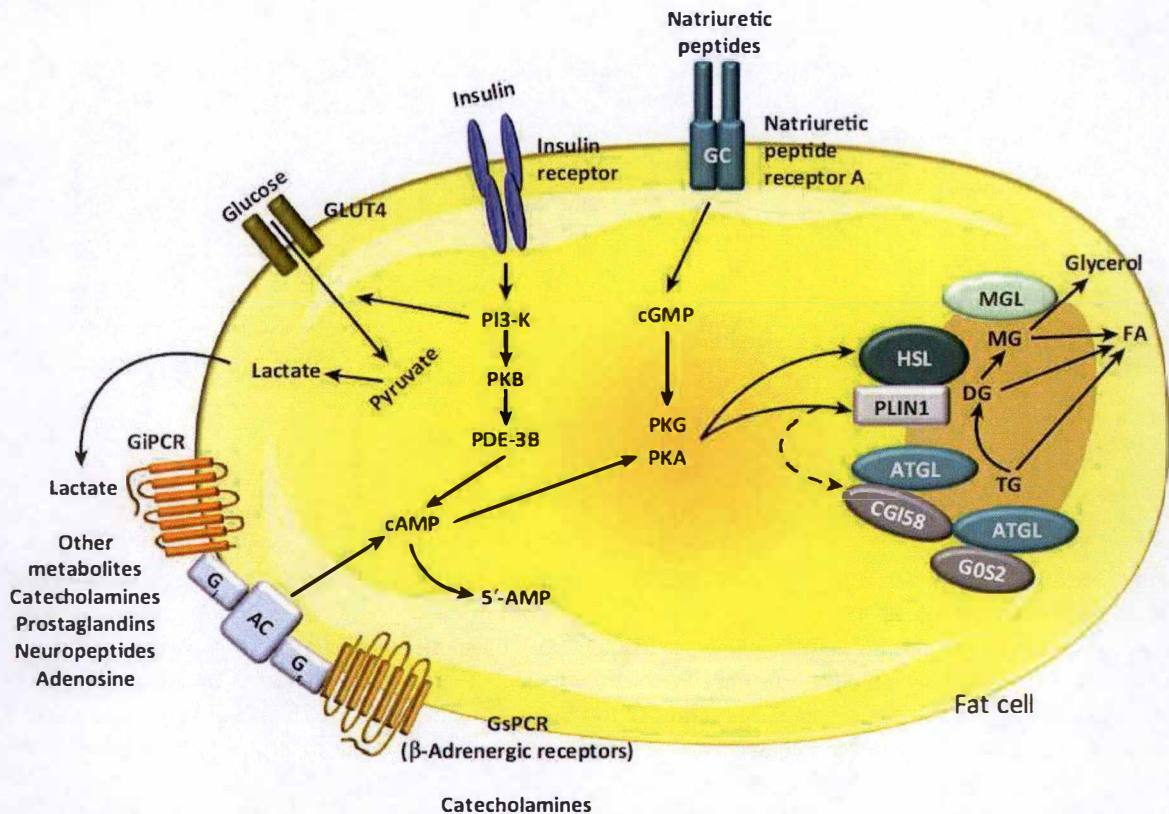


Figure 4 : Régulation de la lipolyse dans les adipocytes (Arner et Langin, 2014).

Les innervations du système nerveux sympathique dans les adipocytes participent à la régulation de la lipolyse. Ainsi, la liaison de la noradrénaline à son récepteur β-adrénergique couplé à l'adényl cyclase via une protéine G mène à une augmentation de la concentration en AMPc. La PKA est activée par cette élévation de la concentration en AMPc et phosphoryle des protéines cibles comme l'HSL et la périlipine 1. La phosphorylation de la périlipine est une étape majeure dans le déclenchement de la lipolyse puisqu'elle permet la libération du CGI58, lui permettant d'interagir avec l'ATGL et de l'activer. La lipolyse implique une coopération enzymatique de ATGL, l'HSL et la MGL résultant en une production d'acides gras et de glycérol. L'ATGL est sujette à une régulation pointue puisque sa liaison avec CGI58 est nécessaire pour que la périlipine puisse la reconnaître alors que G0S2 exerce une inhibition de son activité hydrolase. En se liant au récepteur NPR-A possédant une activité guanylyl cyclase, le natriurétique peptide entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du GMPc ce qui active la PKG et par conséquent la lipolyse. Le neurotransmetteur neuropeptide Y induit une inhibition de la lipolyse via son récepteur couplé à une protéine G inhibitrice. L'insuline inhibe l'effet pro-lipolytique de la catécholamine via l'activation de la PDE-3B qui dégrade l'AMPc ce qui diminue l'activation de la PKA et PKG. La PDE-3B n'est pas active sur la voie du GMPc, donc la PKG peut toujours être activée. Le lactate peut également avoir un effet autocrine anti-lipolytique en se liant à un récepteur Gi récemment identifié comme étant HCA1. D'autres métabolites comme l'adénosine ou les prostaglandines peuvent également avoir des effets anti-lipolytiques.

HSL : *Hormone Sensitive Lipase* ; PLIN1 : *Perilipin 1* ; ATGL : *Adipose Triglyceride Lipase* ; MGL : *Monoglyceride Lipase* ; AMPc : *Adenoside Monophosphate cyclic* ; GsPCR : *G stimulatory Protein Coupled Receptor* ; GiPCR : *G inhibitory Protein Coupled Receptor* ; GLUT4 : *Glucose Transporter 4* ; PDE-3B : *Phosphodiesterase-3B* ; AC : *Adenyl Cyclase* ; DG : *Diglyceride* ; FA : *Fatty Acid* ; Gi : *Inhibitory GTP-binding protein* ; GPCR : *G protein-coupled receptor* ; Gs : *stimulatory GTP-binding protein* ; G0S2, G0/G1 switch 2 ; GC : *Guanylyl Cyclase* ; MG, *Monoglyceride* ; PI3-K : *Phosphatidylinositol-3 Phosphate Kinase* ; NPR-A : *Natriuretic Peptides via type A Receptor* ; CGI58, *Coactivator Comparative Gene Identification 58* ; G0S2 : *G0/G1 switch 2* ; HCA1 : *Gi protein-coupled hydroxycarboxylic acid receptor 1* ; TG : *Triglyceride*.

1.4 Les tissus adipeux

Il existe actuellement trois types d'adipocytes : blanc, brun et « beige » (Lidell et al., 2014). Etant donné que les tissus adipeux blancs représentent les tissus hypertrophiés dans le cadre de l'obésité, nous allons maintenant décrire les structures, localisations et fonctions principales des différents tissus adipeux existants. Les marqueurs adipogéniques de chaque type d'adipocytes sont présentés à la **Figure 3**.

1.4.1 Tissu adipeux blanc

1.4.1.1 Localisation

Chez l'homme, les tissus adipeux blancs sont divisés en 2 sous-groupes : le tissu adipeux blanc sous-cutané (inguinal, fémoral, glutéal) et le tissu adipeux blanc viscéral (épicaudal, gonadal, mésentérique, omental, rétopéritonéal) (**Figure 3**). On a longtemps pensé que ces tissus, dont les localisations anatomiques ont été comparées chez le rongeur et l'homme, ne fournissaient qu'une protection physique contre les chocs et une isolation thermique (Park et al., 2014).

1.4.1.2 Fonction métabolique

Chez les vertébrés supérieurs, la fonction métabolique essentielle du tissu adipeux blanc est de stocker l'excès d'énergie sous forme de triglycérides/triacylglycérols (TG/TAG) dans des gouttelettes lipidiques au sein des adipocytes blancs. Ce processus permet de séquestrer une grande partie des acides gras, de limiter leur libération dans la circulation sanguine et empêche ainsi leur stockage dans les tissus non adipeux, un phénomène connu sous le nom de « gluco-lipotoxicité » (Poitout et al., 2010). Les acides gras stockés peuvent ensuite être mobilisés au cours d'un processus appelé lipolyse. La composition d'une gouttelette lipidique avec les protéines de « shield » (bouclier) comme les périlipines sont présentées à la **Figure 4**. Les acides gras stockés peuvent ensuite être mobilisés par l'activation de la lipolyse (**Figure 4**) (Yin et al., 2003). En condition basale, la lipolyse a lieu constitutivement mais 75 % des acides gras libérés par le tissu adipeux sont ré-estérifiés (Edens et al., 1990), les acides gras non-estérifiés étant toxiques pour la cellule (Leibel et al., 1985). Cependant, lors d'une augmentation de la demande d'énergie, ce processus peut être activé afin d'induire une mobilisation plus importante des acides gras à partir des TG/TAG. A l'heure actuelle, 3 enzymes sont connues pour réguler la libération d'acides gras : la HSL (*hormone sensitive lipase*) (Langin et al., 2005), l'ATGL (*adipose triglyceride lipase*) (Zimmermann et al., 2004) et la MGL (*monoglycérine lipase*) (Fredrikson et al., 1986) (**Figure 4**). Les acides gras libérés dans la circulation sanguine sont alors β -oxydés par les muscles squelettiques, le cœur, le tissu adipeux brun, le rein et le foie à des fins énergétiques (Lafontan et Langin, 2009).

1.4.1.3 Fonction endocrine

Les adipocytes blancs possèdent également une activité endocrine importante permettant un dialogue avec d'autres tissus et organes comme le cœur, le rein, les muscles squelettiques et le pancréas (Maury et Brichard, 2010). Les protéines sécrétées par le tissu adipeux, plus de 300 identifiées à ce jour par des approches protéomiques variées sont

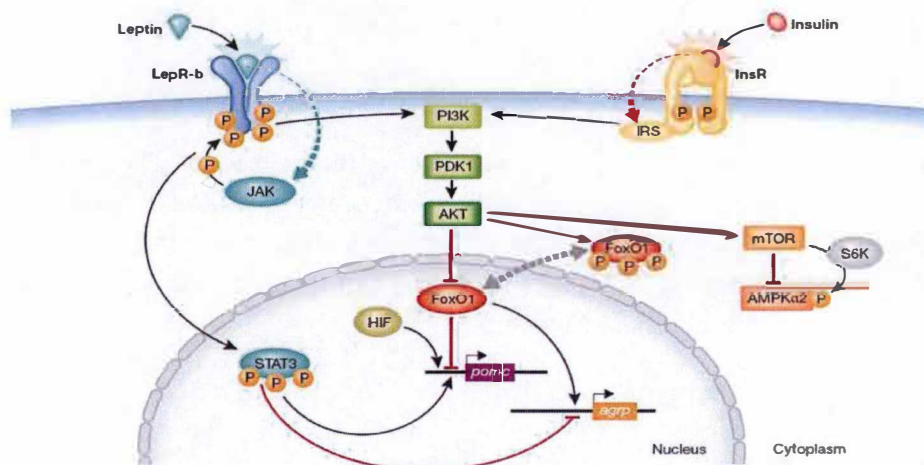


Figure 5 : Voies de signalisation de la leptine et de l'insuline dans les neurones du noyau arcué (Varela et Horvath, 2012).

Le récepteur b de la leptine (LepR-b) est exprimé dans plusieurs zones du cerveau dont l'hypothalamus. Son activation induit plusieurs voies de signalisation dont la mieux caractérisée est la voie de la PI3K menant à la synthèse de PIP₃ à partir de PIP₂ (non montrée sur la figure). L'accumulation de PIP₃ mène à l'activation de PDK1 et d'AKT, cette dernière kinase phosphoryle le facteur de transcription FoxO1 provoquant son export nucléaire. Il en résulte une expression de POMC, un neuropeptide qui stimule la sensation de satiété. L'activation du récepteur LepR-b mène également au recrutement et à l'activation (par phosphorylation) de JAK-STAT3. STAT3 phosphorylé et le facteur de transcription HIF régulent positivement l'expression de POMC. A l'inverse, l'inhibition de FoxO1 par AKT et l'activation de STAT3 conduisent à l'inhibition de l'expression de l'AgRP. L'activation de la PI3K constitue le point de convergence de la voie de signalisation de la leptine et de l'insuline accentuant l'effet de l'insuline sur les neurones. De plus, il a été rapporté que l'inhibition de l'AMPKα2 par la leptine est médiée par la voie mTOR. La phosphorylation est symbolisée par un P entouré et coloré en orange. PIP₃ : *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*; PIP₂ : *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*; PI3K : *Phosphatidylinositol-3-Kinase*; PDK1 : *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*; AKT ou PKB : *Protein kinase B*; FoxO1 : *Forkhead box protein O1*; HIF : *hypoxia inducible factor*; *pomc* : *proopiomelanocortin*; *agrp* : *agouti-related protein*; JAK : *Janus Kinase*; STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*; IRS : *Insulin Receptor Substrate*; mTOR : *Mammalian Target Of Rapamycin*; S6K : *p70 S6 Kinase*; AMPKα2 : *AMP-dependent Kinase alpha 2*.

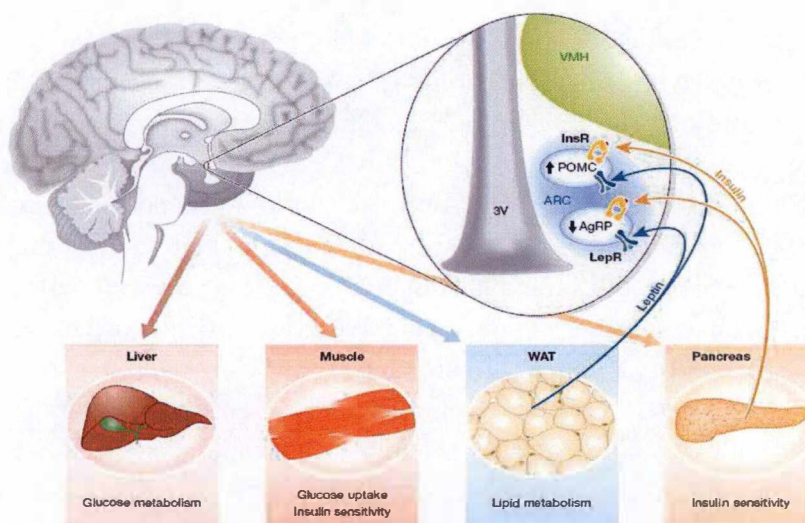


Figure 6 : Effet de la leptine et de l'insuline sur l'hypothalamus et la régulation de plusieurs organes périphériques (Varela et Horvath, 2012).

L'hypothalamus joue un rôle central dans l'intégration des signaux provenant des tissus périphériques comme le pancréas et le tissu adipeux blanc afin de réguler l'homéostasie énergétique. Lors d'un surplus d'énergie, la leptine est sécrétée par le tissu adipeux blanc et induit une dépolarisation (activation) des neurones POMC alors qu'elle induit une hyperpolarisation (inhibition) des neurones AgRP. L'insuline sécrétée par le pancréas informe également l'hypothalamus sur le statut énergétique de l'organisme. En réponse, les neurones de l'hypothalamus expriment des neuropeptides qui ont pour effet d'adapter les fonctions des tissus périphériques comme les muscles et le foie afin de restaurer la balance énergétique, le métabolisme du glucose et des lipides. ARC : *Arcuate Nucleus*; AgRP : *Agouti-Related Protein*; InsR : *Insulin Receptor*; LepR-b : *Leptin receptor b*; POMC : *Proopiomelanocortin*; VMH : *Ventromedial Hypothalamus*; WAT : *White Adipose Tissue*.

appelées adipokines (terme choisi dans ce travail) ou adipocytokines (Lehr et al., 2012). Seules les principales adipokines qui ont été « étudiées » au cours de ce travail sont rapidement décrites ci-dessous.

1.4.1.3.1 Leptine

La leptine est la première adipokine à avoir été identifiée en 1994 (Zhang et al., 1994). Hormone de 16 kDa, la leptine est codée par le gène *Ob*, rebaptisé par la suite *LEP* chez l'humain. Synthétisée principalement par le tissu adipeux blanc, la leptine cible l'hypothalamus, le pancréas, le foie et le système immunitaire (Maury et Brichard, 2010). Le niveau d'expression de la leptine est donc positivement corrélé à la quantité de masse graisseuse corporelle ainsi qu'à la concentration plasmatique en insuline (Considine et al., 1996). Les voies de signalisation intracellulaires activées par la leptine dans les tissus sensibles (neuronaux et périphériques) sont décrites à la **Figure 5**.

Du point de vue fonctionnel, la leptine régule la prise alimentaire et la dépense énergétique en agissant sur le noyau arqué de l'hypothalamus (Schwartz et al., 1997). Dans cette partie basale de l'hypothalamus se trouvent deux populations de neurones caractérisées par l'expression spécifique de neuropeptides : les neurones POMC (*pro-opiomélanocortine*) et AgRP (*agouti-related protein*), exprimant chacun un neuropeptide du même nom (Dietrich et Horvath, 2009). L'expression de POMC induit un effet anorexigénique (inhibiteur de l'appétit) et est activée par la leptine alors que l'expression de l'AgRP et du neuropeptide Y entraîne un effet orexigénique (activateur de l'appétit) et est inhibée par la leptine (Morrison et al., 2005) (**Figure 6**).

En plus de son rôle métabolique, la leptine est également considérée comme une adipokine pro-inflammatoire. En effet, la leptine induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (*Interleukine 6*), l'IL-12 (*Interleukine 12*) et le TNF α (*Tumor-necrosis factor α*) par les macrophages et les monocytes (Gainsford et al., 1996; Zarkesh-Esfahani et al., 2004), alors qu'elle inhibe la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 (*Interleukine 4*) (Lord et al., 1998). A travers l'activation de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) dans les cellules hépatiques périsinusoïdales humaines, la leptine active l'expression de CCL2 et du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), respectivement, une molécule pro-inflammatoire et pro-angiogénique (Aleffi et al., 2005). Différentes conditions influencent l'expression de la leptine : la prise alimentaire (Zhang et al., 2002) et l'obésité (Frederich et al., 1995) sont connues pour augmenter son expression alors que le jeûne la diminue (Zhang et al., 2002).

Au niveau transcriptionnel, l'expression du gène *LEP* est activée par le facteur de transcription C/EBP α (*CCAAT-Enhancer Binding Protein Alpha*) (Hwang et al., 1996; Miller et al., 1996) et réprimée par le facteur de transcription PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma*) dans les adipocytes 3T3-L1 (Kallen and Lazar, 1996). En effet, le traitement des rats adultes Sprague-Dawley ou d'adipocytes primaires avec le thiazolidinedione (TZD) BRL49653, un agoniste du facteur de transcription PPAR γ , mène à une répression de l'expression de la leptine (Hollenberg et al., 1997; De Vos et al., 1996). Quatre autres facteurs de transcription : ADD1/SREBP1 (*Adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/Sterol regulatory element-binding protein*) (Kim et al., 1998), FOSL2 (*Fos-related antigen 2*) (Wrann et al., 2012) et Spl (*Specificity protein 1*)

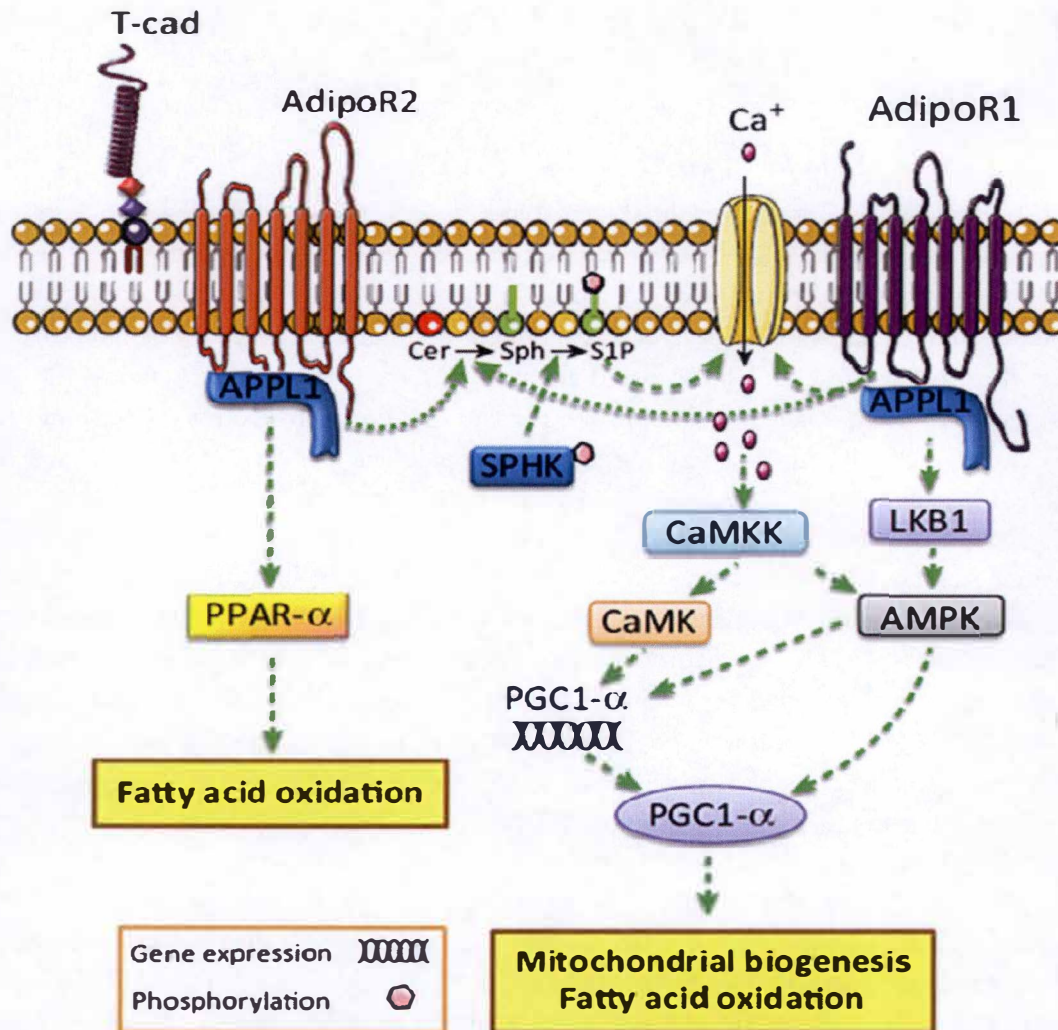


Figure 7 : Voies de signalisation de l'adiponectine et effet sur la sensibilité à l'insuline (Esmaili et al., 2014).

L'adiponectine possède 3 récepteurs : l'AdipoR1, l'AdipoR2 qui possède 7 domaines transmembranaires et plus récemment découvert la T-cad qui ne possède pas de domaine intracellulaire. L'adiponectine globulaire possède davantage d'affinité pour l'AdipoR1 alors que l'adiponectine regroupant la forme multimère, trimère et oligomère possède davantage d'affinité pour l'AdipoR2. AdipoR1 et AdipoR2 peuvent tous deux interagir avec l'APPL1. Exprimé principalement dans le foie, l'activation de l'AdipoR2 mène à la stimulation de l'activité transcriptionnelle de PPARα favorisant l'expression d'enzymes impliquées dans la β-oxydation des acides gras. L'AdipoR1 augmente l'influx de calcium permettant l'activation de la CaMKK (une kinase). La CaMKK active alors la CaMK et l'AMPK résultant en une augmentation de l'expression de PGC1-α. Par son activité, PGC1-α régule positivement la biogenèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras. L'adiponectine médie l'interaction entre l'AdipoR1 et l'APPL1 induisant une activation successive de LKB1 et de l'AMPK. L'AMPK peut aussi activer la PGC1-α au niveau post-traductionnel. AdipoR1/2 possèdent tous deux une activité céramidase permettant la conversion de céramide (Cer) en sphingosine (Sph). La sphingosine peut ensuite être phosphorylée par une SPHK1 pour produire du sphingosine-1 phosphate (S1P). Le S1P permet une augmentation de l'influx de calcium dans la cellule. La signalisation activée par le récepteur T-cad n'a pas encore été caractérisée.

CaMKK : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase ; APPL1 : Adaptor protein containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine-binding domain, and Leucine zipper motif; LKB1 : Liver Kinase B1 ; AdipoR1 et 2: Adiponectin Receptor 1 et 2 ; PGC1-α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) gamma Coactivator 1 alpha ; SPHK1 : Sphingosine Kinase 1 ; S1P : Sphingosine-1-Phosphate ; T-cad : T-cadherin.

(Moreno-Aliaga et al., 2007) sont également connus pour activer l'expression du gène *LEP* alors que le facteur de transcription AP-2 β (*Activating protein-2 beta*) réprime son expression (Fuke et al., 2010).

1.4.1.3.2 Adiponectine

L'adiponectine est encodée par le gène *ADIPOQ* et est l'hormone la plus exprimée par le tissu adipeux blanc (Hotta et al., 2001). L'adiponectine plasmatique circule sous 3 formes majeures : trimère, hexamère et multimère. Cette dernière est la forme la plus active (Waki et al., 2003). Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'adiponectine dans les tissus sensibles sont décrites à la **Figure 7**. Les voies de signalisation de l'adiponectine sont médiées par 3 récepteurs : AdipoR1, AdipoR2 et T-cad dont les différences au niveau des voies de signalisation sont illustrées à la **Figure 7**. Le premier est exprimé de manière ubiquitaire alors que le second est plus spécifiquement exprimé dans le tissu hépatique (Yamauchi et al., 2007). La liaison de l'adiponectine aux deux récepteurs favorise le recrutement de l'APPL1 (*adaptator protein, phosphotyrosine interaction 1*) et l'activation de l'AMPK par phosphorylation (Awazawa et al., 2009). L'AMPK phosphoryle et inactive ensuite l'ACC (*Acetyl-Coenzyme A carboxylase*) conduisant à une diminution de la production de malonyl-CoA nécessaire à la synthèse des lipides et à une augmentation de la β -oxydation des acides gras (Yamauchi et al., 2002). Par la voie dépendante de l'AMPK (plus spécifiquement déclenchée par l'activation du récepteur AdipoR1), l'adiponectine induit également une diminution de l'expression de SREBP1c (*Sterol regulatory element-binding protein 1c*) (Awazawa et al., 2009), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la synthèse des lipides et du cholestérol (Bengoechea-Alonso et Ericsson, 2007). En conduisant à l'activation de PPAR γ , l'adiponectine augmente l'expression d'enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras comme la LCAD (*long chain acyl-CoA dehydrogenase*) (You et al., 2005).

Une réduction de l'adiponectine plasmatique observée chez des rats soumis à un régime riche en graisses mène à une diminution de la β -oxydation des acides gras ainsi qu'à l'absence de phosphorylation d'Akt et d'AS160 dans les muscles squelettiques suggérant un rôle de l'adiponectine dans la sensibilité à l'insuline (Mullen et al., 2009). L'adiponectine régule, à la baisse, la gluconéogenèse dans le foie par une diminution du niveau d'expression de la PEPCK (*Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase*) et de la G6Pase (*Glucose 6 Phosphatase*) (Miller et al., 2011). En plus de son action sur le foie et le muscle squelettique, l'adiponectine cible également le pancréas où elle stimule la sécrétion d'insuline médiée par le glucose et inhibe l'apoptose des cellules β du pancréas (Wijesekara et al., 2010). En résumé, l'adiponectine augmente la sensibilité des tissus répondant à l'insuline.

En plus de ces rôles métaboliques, l'adiponectine joue également un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. En effet, en inhibant l'activation du facteur nucléaire NF-kB (Okamoto et al., 2002), l'adiponectine diminue la production de TNF α par les macrophages lui conférant ainsi des propriétés anti-inflammatoires (Xu et al., 2003). De plus, l'adiponectine est également capable de stimuler la production de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Kumada et al., 2004).

Au niveau transcriptionnel, plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation de son expression. Premièrement, la liaison du facteur de transcription

PPAR γ augmente son expression. En effet, le traitement de souris obèses et diabétiques (souris *db/db* : invalidées pour le récepteur de la leptine) par des agonistes de PPAR γ comme les TZD augmente l'expression de l'adiponectine (Chen et al., 1996; Combs et al., 2002). D'autres facteurs de transcription, étudiés dans les adipocytes 3T3-L1, tels que C/EBP et NF-Y (*nuclear factor-Y*) participent également à la régulation positive de son expression (Park et al., 2004). Enfin, il a également été montré que la liaison du facteur de transcription SREBP-1c à l'ADN, modulé par les régulateurs E47 (*E-protein 47*) et Id3 (*Inhibitor of differentiation 3*), médie également l'expression de l'adiponectine (Doran et al., 2008).

Une caractéristique importante retrouvée chez les patients obèses et/ou diabétiques de type 2 est une diminution de la concentration plasmatique en adiponectine par rapport aux individus minces (Li et al., 2009). Cette diminution de la concentration en adiponectine circulante est expliquée par l'inhibition exercée par les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-6 sur l'expression de l'adiponectine (Lim et al., 2008). Néanmoins, le traitement de souris lipoatrophiques, caractérisées par une concentration élevée en acides gras libres dans le sang, un contenu en TG/TAG important dans les muscles squelettiques et le foie et une hyperinsulinémie, au moyen de l'adiponectine et de la leptine permet d'améliorer leur sensibilité à l'insuline (Yamauchi et al., 2001). Etant donné le lien étroit existant entre la concentration en adiponectine et la sensibilité à l'insuline, S_A , le rapport entre l'adiponectine de haut poids moléculaire et l'adiponectine totale du sérum, est actuellement employé comme un indicateur de la sensibilité à l'insuline (Meyer et al., 2013).

1.4.1.3.3 Résistine

La résistine encodée par le gène *FIZZ1*, renommé *Retn* par la suite, est un polypeptide riche en cystéine de 12,5 kDa (Holcomb et al., 2000). La résistine existe sous 2 formes : trimère et hexamère. Cette dernière est la forme la plus abondante mais la moins active dans l'induction de la résistance à l'insuline (Kwon et Pessin, 2013). L'expression de la résistine diffère selon l'espèce considérée. Chez les rongeurs, l'expression de la résistine est limitée aux adipocytes (Hartman et al., 2002) alors que les macrophages et les monocytes constituent les principales sources de résistine chez l'homme (Patel et al., 2003). De plus, chez l'homme, l'expression du gène codant pour la résistine est plus élevée dans le tissu adipeux blanc par rapport au tissu adipeux brun (Kajimura et al., 2008).

La résistine a été initialement identifiée comme un inducteur de l'inflammation pulmonaire (Holcomb et al., 2000). Inversement, un état inflammatoire induit l'expression de la résistine. En effet, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α sont les principaux inducteurs dans les PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) humaines (Kaser et al., 2003) alors que le TNF α induit une inhibition de l'expression de la résistine dans les adipocytes 3T3-L1 (Fasshauer et al., 2001).

La résistine peut également induire une résistance à l'insuline (Steppan et al., 2001) impliquant notamment l'activation de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), un suppresseur des voies de signalisation de l'insuline (Steppan et al., 2001). Cependant, le lien entre l'augmentation de la concentration circulante en résistine et la sensibilité à l'insuline, clairement identifié chez les rongeurs, n'a pas (encore) été démontré chez l'homme. On notera également que l'insuline réprime directement l'expression de la résistine (Haugen et al., 2001).

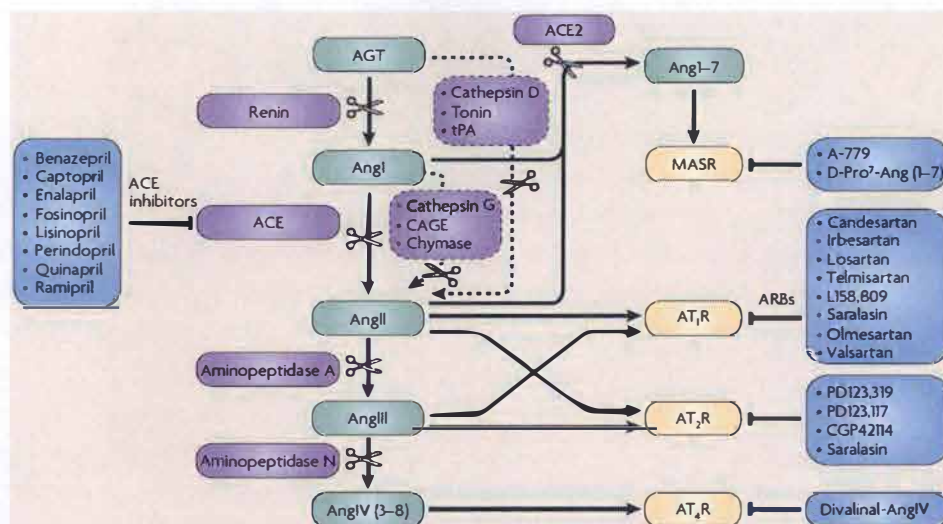


Figure 8 : Représentation globale du système rénine-angiotensine (SRA) (George et al., 2010).

L'angiotensinogène (AGT) libérée par le foie et le tissu adipeux entre dans la voie de clivage « classique » incluant la rénine, l'ACE, l'aminopeptidase A et l'aminopeptidase N. Le rein libère la rénine en réponse à une diminution de la pression sanguine et/ou à une réduction de la concentration plasmatique en sodium. Grâce à son activité protéase, la rénine clive l'AGT en AngI qui est exprimée par les cellules endothéliales du poumon. L'AngI est ensuite clivée par l'ACE en AngII. L'extrémité C-terminale de l'AngI ou l'AngII peut également être protéolysée par l'ACE2, un homologue de ACE et ainsi former de l'Ang1-7. L'Ang1-7 antagonise l'action de l'AngII au niveau cardiovasculaire en se liant à son récepteur MASR. La cathepsine, la Tonin et la tPA produisent directement de l'AngII à partir de l'AGT. Des enzymes alternatives de la voie classique interviennent également dans la cascade de clivage comme la cathepsine G, la CAGE ou la chymase (encadré mauve en pointillé). Ensuite, l'AngII peut être clivée par l'aminopeptidase A ou N afin de produire l'AngIII ou l'AngIV (ou Ang3-8), respectivement. L'Ang3-8 active son récepteur IRAP ou AT4R et induit différents effets cardiovasculaires. MASR, AT1R, AT2R et AT4R représentent les différents récepteurs qui sont activés par les différents peptides angiotensines, lesquels médient des réponses biologiques variées. Un dysfonctionnement de l'axe hormonal rénine-angiotensine peut conduire à diverses complications comme l'hypertension et le diabète ou être associé à des maladies cardiovasculaires raison pour laquelle des inhibiteurs du SRA ont été mis au point (encadrés bleus). AGT : Angiotensinogen ; ACE : Angiotensin-converting enzyme ; ARB : angiotensin receptor blockers. CAGE : chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme. MASR : MAS-related G protein-coupled receptor A ; IRAP : insulin-regulated amino peptidase. Ang : Angiotensine ; ATR : Angiotensinogen type receptor.

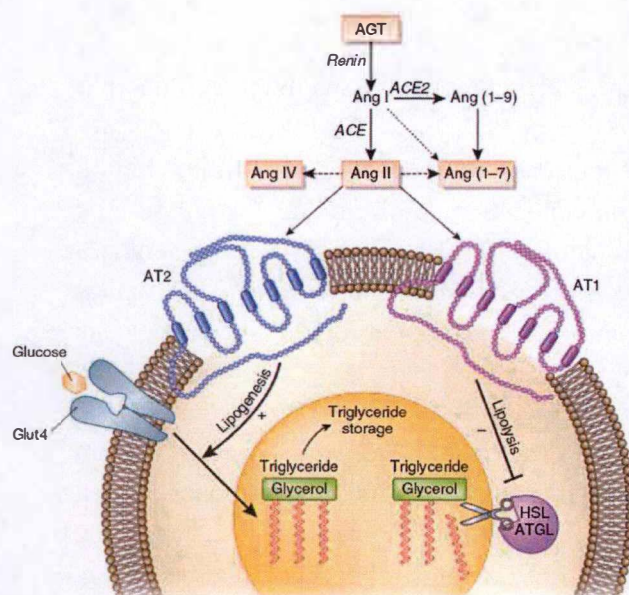


Figure 9 : Effet synergique de l'activation des récepteurs AT1R et AT2R sur le tissu adipeux (Yvan-Charvet et Quignard-Boulangé, 2011).

L'angiotensine II est formée à partir d'une cascade enzymatique comportant la rénine et l'ACE. L'angiotensine II médie l'effet de l'angiotensinogène au niveau du tissu adipeux en modulant l'expansion de la masse grasseuse via l'activation de 2 récepteurs exprimés en membrane plasmique des adipocytes chez l'homme et chez la souris : AT1R et AT2R. En fonctionnant comme une hormone anti-lipolytique, l'AngII active AT1R. AT1R entraîne alors une diminution de la lipolyse en inhibant l'activité des lipases HSL et ATGL. L'activation d'AT2R active la lipogenèse en augmentant l'entrée du glucose dans la cellule. Celui-ci fournira l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse des acides gras stockés sous forme de triglycérides. ACE : angiotensin-converting enzyme ;

AGT : angiotensinogen ; Ang : angiotensin ; ATGL, adipose triglyceride lipase ; Glut4 : glucose transporter 4 ; HSL : hormone-sensitive lipase ; AT1R : Ang type I receptor ; AT2R : Ang type II receptor.

La résistine semble également jouer un rôle régulateur sur la gluconéogenèse hépatique. En effet, des souris KO pour la résistine montrent une plus faible concentration sanguine en glucose après un jeûne, ceci pouvant être expliqué par une régulation à la baisse de la gluconéogenèse hépatique (Banerjee et al., 2004). De plus, une forte concentration en glucose augmente également l'expression de la résistine dans les adipocytes 3T3-L1 (Shojima et al., 2002).

Concernant les régulateurs transcriptionnels impliqués dans l'expression du gène, C/EBP α et ADD1 aussi appelé SREBP1c peuvent être considérés comme des facteurs de transcription clés dans l'activation du promoteur du gène codant pour la résistine. Ceci a été démontré, tant *in vitro* sur des adipocytes 3T3-L1 qu'*in vivo* chez des souris mâles C57BL/6J (Seo et al., 2003). Des agonistes de PPAR γ atténuent aussi la réponse inflammatoire en réprimant l'expression de *RETN* dans les macrophages humains (Patel et al., 2003) et dans les adipocytes 3T3-L1 (Shojima et al., 2002) suggérant un rôle de PPAR γ dans la régulation transcriptionnelle de cette adipokine (Bokarewa et al., 2005).

1.4.1.3.4 Angiotensinogène

L'angiotensinogène est une glycoprotéine codée par le gène *Agt* et principalement synthétisée par le foie (Massiera et al., 2001). Cependant, le tissu adipeux viscéral constitue la majeure source extra-hépatique de l'angiotensinogène (Giacchetti et al., 2000). L'angiotensinogène peut se lier à 2 récepteurs, AT1R et AT2R (*Angiotensinogen Type 1 or 2 Receptor*). Le récepteur AT1R est un récepteur couplé à une protéine G, et est exprimé dans le rein, les vaisseaux sanguins, le cerveau (Ohsawa et al., 2014) et les adipocytes (Cabassi et al., 2005). La fonction d'AT2R est encore peu connue bien que son activation semble induire un effet antagoniste sur l'activation du récepteur AT1R (Kemp et al., 2014).

L'angiotensinogène participe au système rénine-angiotensine (RAS), un axe hormonal impliquant le rein et le foie (**Figure 8**) (Engeli et al., 2003). En effet, en réponse à des signaux comme la diminution de la pression sanguine, le rein libère la rénine pour hydrolyser l'angiotensinogène en un décapeptide, angiotensine I, qui sera lui-même clivé par des enzymes de conversion en un octapeptide, l'angiotensine II ou en un heptapeptide, l'angiotensine III (George et al., 2010). Chez l'homme, l'effet vasoconstricteur est principalement médié par l'angiotensine II, qui stimule également la production d'aldostérone par le cortex surrénalien menant à une augmentation de la réabsorption d'eau et de sodium au niveau rénal (Engeli et al., 2003). Au niveau métabolique, l'angiotensine II active la lipolyse du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal (RET) et épидidymal chez des rats Sprague Dawley (Cabassi et al., 2005). En activant le récepteur AT1R, l'AngII initie plusieurs voies de signalisation dont l'activation de la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)/ERK (*Extracellular signal-Related Kinase*) et JAK (*Janus Kinase*). L'expression de cytokines ou le remodelage de la matrice extracellulaire est le résultat de l'activation de divers facteurs de transcription en aval de ces voies de signalisation comme STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*), NF-kB et GATA (*GATA binding protein*) (Kemp et al., 2014). Cette adipokine exercerait également un rôle dans la régulation de l'adipogenèse (**Figure 9**). En effet, l'inhibition d'AT1R par le « Valsartan » induit une inhibition de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines en adipocytes *in vitro*, alors que l'inhibition d'AT2R par

l'inhibiteur PD123319 favorise la différenciation (Matsushita et al., 2006). De plus, l'invalidation de l'expression de l'angiotensinogène dans les adipocytes 3T3-L1 conduit à une diminution d'expression de plusieurs gènes pro-adipogéniques et pro-inflammatoires comme, respectivement, PPAR γ et TNF α (Carroll et al., 2013).

Ces résultats mettent en lumière le rôle potentiel de l'angiotensinogène dans le métabolisme des adipocytes et l'inflammation des tissus adipeux (Carroll et al., 2013). Ajoutons également que la sur-expression ciblée de l'angiotensinogène au niveau du tissu adipeux, conduit à une augmentation de la masse grasseuse et à l'hypertension (Massiera et al., 2001). Enfin, un lien existe également entre l'angiotensinogène et la sensibilité à l'insuline. En effet, l'inhibition de l'activation du récepteur ATR1 par l'inhibiteur TAK-536 dans des souris KKA^y (un modèle de souris diabétique) révèle une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans les tissus adipeux blancs et les muscles squelettiques (Iwai et al., 2009).

Au niveau transcriptionnel, l'incubation d'adipocytes 3T3-L1 en présence de troglitazone, un agoniste de PPAR γ , induit la répression d'un groupe de gènes incluant l'angiotensinogène normalement exprimé dans les adipocytes blancs. Les auteurs suggèrent que cette répression est assurée par le recrutement de co-répresseur CtBP1 et CtBP2 (*C-terminal Binding Protein 1 or 2*) sur le facteur de transcription C/EBP α , formant un complexe avec PPAR γ en réponse à la troglitazone (Vernochet et al., 2009).

1.4.1.3.5 Sérum amyloïd A1

Les protéines « sérum amyloïd A » (SAA) sont codées par une famille de 4 gènes (SAA1-SAA4) conservés chez la plupart des vertébrés (Sellar et al., 1994). Chez l'homme, SAA1 et SAA2 sont principalement exprimés par le tissu adipeux blanc alors que, en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, le foie constitue la principale source chez la souris (Poitou et al., 2005 ; Yang et al., 2006). Le rôle majeur des protéines SAA est de réguler le métabolisme du cholestérol. En raison de sa similarité structurale avec d'autres apolipoprotéines (Takase et al., 2014), SAA1 peut remplacer apoA1, l'apolipoprotéine majeure du HDL responsable du transport du cholestérol (O'Brien et al., 2006). Les HDLs sont captés par le récepteur scavenger SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) des hépatocytes auxquels ils fournissent les esters de cholestérol qu'ils contiennent, un processus nommé absorption sélective de lipides dans le transport inverse du cholestérol (allant des tissus au foie) (Rigotti et al., 2003). Les protéines SAA1 et SAA2, sont connues pour exercer un effet inhibiteur de la liaison des HDLs au récepteur SR-BI pouvant ainsi contribuer à l'accumulation de cholestérol dans la paroi interne des artères, un processus impliqué dans le développement de l'athérosclérose (Lewis et al., 2004). Ainsi, l'effet protecteur de l'apoA1 sur le développement de l'athérosclérose peut être levé par l'action de SAA en condition d'inflammation chronique.

L'expression et la sécrétion de SAA1 et SAA2 sont positivement corrélées à l'indice de masse corporelle. Ces adipokines stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF α par les pré-adipocytes et les adipocytes *in vitro* (Yang et al., 2006). *In vivo*, les protéines SAAs provoqueraient donc, indirectement, un recrutement de monocytes dans les tissus adipeux de patients obèses et par conséquent contribueraient à l'installation d'un état inflammatoire chronique léger dit de « bas grade » (Yang et al., 2006; Xu et al.,

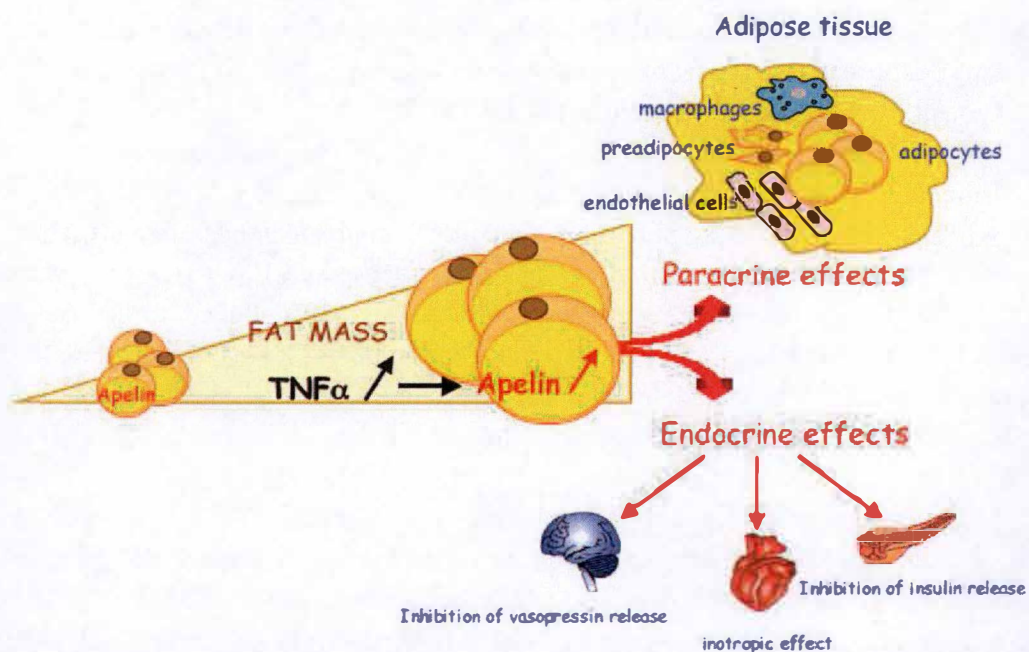


Figure 10 : Rôles putatifs de l'apéline sécrétée par le tissu adipeux en réponse au TNF α (Daviaud et al., 2006).

Une corrélation existe entre l'expression du TNF α et l'expression de l'apéline chez les individus modérément obèses et les individus atteints d'obésité morbide. L'injection intra-péritonéale de TNF α résulte en une augmentation de l'expression et de la concentration plasmatique de l'apéline chez la souris. La production d'apéline augmente également et contribue à l'inhibition de la sensibilité à l'insuline notamment en diminuant la sécrétion d'insuline par le pancréas chez la souris. En lien avec sa fonction endocrine, l'apéline est également impliquée dans la régulation des fonctions cardiovasculaires en changeant la force de contraction du muscle cardiaque. L'apéline intervient dans la régulation de l'homéostasie hydrique par son rôle anti-diurétique en induisant l'inhibition de la libération de la vasopressine résultant en une augmentation de la réabsorption d'eau. Les changements d'expression de l'apéline induits par le TNF α en réponse à l'obésité peuvent donc jouer un rôle dans les dérégulations du tissu adipeux comme l'inflammation chronique légère en stimulant le recrutement de macrophages.

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*.

2003). En plus d'être pro-inflammatoire, la protéine SAA1 stimule également la lipolyse et pourrait donc contribuer au développement de la résistance à l'insuline par la libération d'acides gras libres dans la circulation sanguine (Yang et al., 2006).

Des agonistes de PPAR γ , comme la rosiglitazone provoquent une diminution significative de la production de SAA1-2 (Yang et al., 2006; de Seny et al., 2013), indiquant que ce facteur de transcription agit probablement comme un répresseur dans le contrôle de l'expression de cette adipokine.

1.4.1.3.6 Apéline

Le gène *Apln* codant pour la pré-proapéline est exprimé par de nombreux tissus et organes tels que le poumon, la glande mammaire, les testicules, les reins, le cœur et les tissus adipeux blancs (Tatemoto et al., 1998). Dans les adipocytes 3T3F442A, le niveau d'expression de l'apéline augmente au cours de la différenciation (Boucher et al., 2005). La pré-proapéline est le précurseur des 3 formes actives de l'apéline : apéline 13, apéline 17 et apéline 36. Une des fonctions de l'apéline est d'assurer la régulation de l'homéostasie hydrique (De Mota et al., 2004) et du débit cardiaque (Ashley et al., 2005). L'apéline semble également jouer un rôle dans la régulation de la lipolyse, puisque la stimulation d'adipocytes murins 3T3-L1 par l'apéline augmente la phosphorylation inhibitrice (Ser 565) de la HSL inhibant ainsi la lipolyse (Yue et al., 2011). L'apéline pourrait également jouer un autre rôle important dans le métabolisme énergétique en régulant, de manière positive, l'expression d'UCP-1 (*Uncoupling protein-1*) dans le tissu adipeux brun (Higuchi et al., 2007). Ajoutons encore que des souris C57BL/6J rendues obèses par un régime riche en graisses ou rendues hyperphagiques par un traitement au GTG (*Gold Thioglucose*) présentent à la fois une hyperinsulinémie et une sur-expression de l'apéline par rapport aux souris contrôles soumises au régime normal, suggérant un contrôle de l'insuline sur l'expression de l'apéline (Boucher et al., 2005). Il a également été montré récemment que l'administration d'apéline (2mg/kg/jour) à des souris APKO (déficience généralisée pour l'apéline) et à des souris *db/db* pendant 4 et 2 semaines respectivement, induit une amélioration de la sensibilité des muscles à l'insuline par un mécanisme dépendant de la phosphorylation d'Akt et de l'AMPK (Yue et al., 2011). L'inflammation a également été associée à l'augmentation d'expression de l'apéline par les tissus adipeux des individus obèses. En effet, la sur-expression de l'apéline chez ces individus pourrait résulter d'un effet paracrine/autocrine du TNF α sur le tissu adipeux (**Figure 10**) (Daviaud et al., 2006). La voie de signalisation du TNF α responsable de l'augmentation de l'expression de l'apéline dépend de la PI3K, de JNKs (*c-Jun NH2-terminal kinases*) et de MAPKs mais pas de l'activation de PKCs (Daviaud et al., 2006).

Bien que la régulation de l'expression de l'apéline ne soit pas encore bien comprise, la sur-expression de PGC-1 α (*peroxysome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α*) dans les adipocytes humains induit l'expression et la sécrétion de l'apéline (Mazzucotelli et al., 2008). Ce co-activateur de PPAR γ (et d'autres facteurs de transcription) est notamment impliqué dans la biogenèse mitochondriale, l'homéostasie énergétique et contrôlerait également l'expression de l'apéline. Enfin, lorsque des adipocytes humains sont maintenus en condition d'hypoxie, la liaison du facteur de transcription HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*) au promoteur du gène *Apln* induit également l'expression de l'apéline (Greiger et al., 2011).

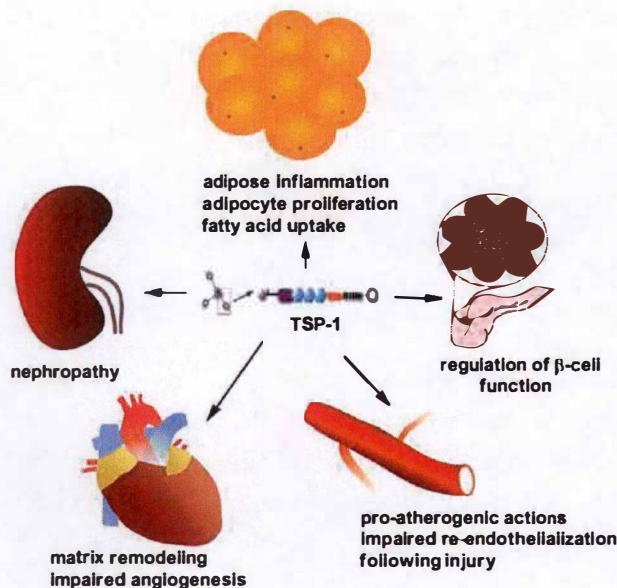


Figure 11 : Implication de la thrombospondine-1 dans les dérégulations métaboliques suite au diabète et à l'obésité (Kong et al., 2014).

Dans le pancréas, la TSP-1 est produite par les cellules endothéliales et est impliquée dans la régulation des cellules β en contrôlant leur croissance et la sécrétion d'insuline. La TSP-1 joue également un rôle dans la néphropathie diabétique à travers l'activation de TGF- β (*transforming growth factor-beta*). La TSP-1 présente également des propriétés anti-angiogéniques et pro-athérogéniques pouvant conduire à l'apparition de complications vasculaires. La TSP-1 peut aussi influencer le remodelage de la matrice extracellulaire en activant des métalloprotéinases de la matrice pouvant ainsi contribuer à une dilatation ventriculaire. Au sein du tissu adipeux, l'augmentation de l'expression de la

TSP-1 est associée à l'inflammation et module l'expansion du tissu adipeux à travers une augmentation de l'absorption des acides gras.

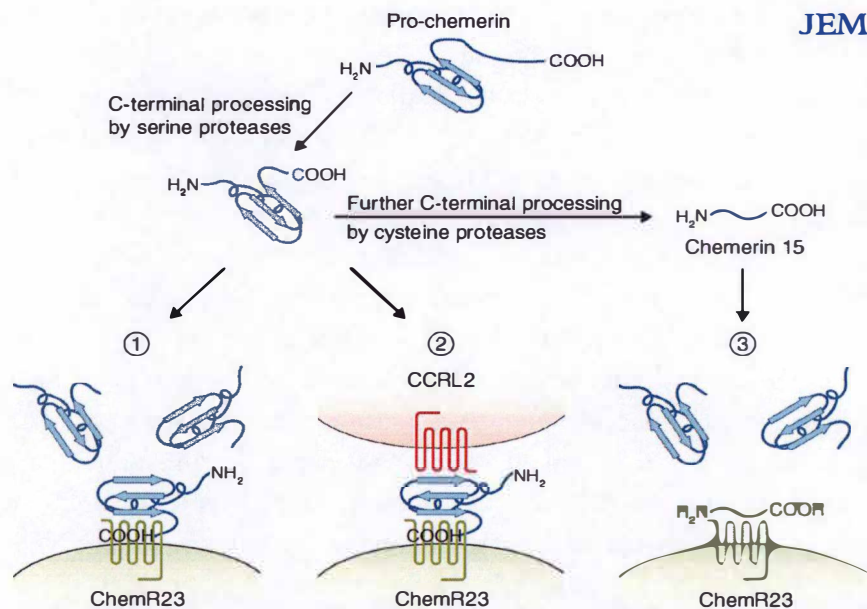


Figure 12 : Régulation de la réponse inflammatoire par la chémérine (Yoshimura et Oppenheim, 2008).

La chémérine est sécrétée sous forme de précurseur (pro-chémérine) de 143 acides aminés. La première forme active de la chémérine est obtenue par clivage de l'extrémité C-terminale de la pro-chémérine par des sérines protéases sécrétées par des neutrophiles. Premièrement, la forme active de la chémérine (137 acides aminés) peut soit activer un récepteur couplé aux protéines G, ChemR23 connu sous le nom de CMKLR1, présent à la surface des macrophages et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (1). Il en résulte une induction de la migration cellulaire et une modification du flux de calcium intracellulaire. Deuxièmement, la chémérine joue un rôle dans l'interaction entre les mastocytes et les macrophages via les récepteurs CCRL2 et ChemR23, l'extrémité N-terminale de la chémérine interagissant avec le CCRL2 et l'extrémité C-terminale interagissant avec le ChemR23 (2). Troisièmement, la chémérine active peut encore être clivée en un peptide inhibiteur (chémérine 15) par des cystéines protéases sécrétées par des macrophages. La chémérine 15 inhibe la génération de médiateurs pro-inflammatoires en réponse au LPS/IFN- γ (3). CMKLR1 : *chemokine-like receptor 1* ; CCRL2 : *Chemokine (C-C motif) receptor-like 2*. LPS/IFN- γ : *Lipopolysaccharide/Interferon gamma*.

1.4.1.3.7 *Thrombospondine-1*

La thrombospondine-1 (TSP-1) est codée par le gène *Thbs1* et produite par plusieurs types cellulaires : les mégacaryocytes, les macrophages et les adipocytes (Okuno et al., 2002). La TSP-1 est d'abord connue pour son effet inhibiteur de la voie de signalisation induite par le NO (*nitric oxide*)-GMPc dans les cellules vasculaires endothéliales impliquées dans la néo-vascularisation des tumeurs solides expliquant ainsi son potentiel en tant qu'inhibiteur de l'angiogenèse et de la tumorigenèse. Bien que la souris KO pour la TSP-1 ne présente pas de phénotype notable en absence de plaie (Lawler et al., 1998), l'angiogenèse dans le tissu adipeux induite par le froid ou par le gain de poids semble être modulée par la balance entre les adipokines pro- ou anti-angiogéniques comme, respectivement, l'adiponectine ou la TSP-1 (Xue et al., 2009). La TSP-1 joue également un rôle dans le métabolisme lipidique des adipocytes murins. En effet, la mutation du gène *Thbs1* ou l'absence du récepteur CD36, son ligand majeur, conduit à un déficit d'absorption des acides gras par ces cellules (Hajri et al., 2002).

Concernant les facteurs externes, l'exercice physique et la restriction calorique induisent une diminution de l'expression de la TSP-1 (Wheatley et al., 2011). L'obésité influence également directement l'expression de TSP-1. En effet, chez les individus obèses (**Figure 11**), le niveau d'expression de la TSP-1 est plus élevé dans le tissu adipeux viscéral par rapport au tissu adipeux sous-cutané (Ramis et al., 2005).

Par contre, peu de données relatives aux régulateurs de l'expression de *Thbs1* sont disponibles actuellement. Une fois encore, son expression semble être sous le contrôle de PPAR γ car l'expression de *Thbs1* est diminuée de 54 % en réponse aux agonistes de PPAR γ dans les adipocytes humains, ce qui semble contradictoire avec l'analyse de l'expression de l'adipokine en réponse au TNF α puisque PPAR γ est moins actif dans les cellules traitées au TNF α (Varma et al., 2008). Ces données révèlent aussi une différence dans le mécanisme de régulation de l'expression de la TSP-1 entre les adipocytes humains et les adipocytes murins 3T3-L1.

1.4.1.3.8 *Chémérine*

Fortement exprimée par les tissus adipeux blancs, le foie et le placenta (Goralski et al., 2007), la chémérine est codée par le gène *Rarres2* et est un ligand du récepteur ChemR23, un récepteur couplé à une protéine G, exprimée à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et des adipocytes (Wittamer et al., 2003). Au niveau du tissu adipeux, la chémérine exerce un effet autocrine et paracrine. Des souris KO pour le récepteur ChemR23 présentent une diminution de l'infiltration de lymphocytes CD3⁺ et de l'absorption du glucose dans le tissu adipeux blanc alors qu'une augmentation du nombre de cellules « natural killer » est observée (Ernst et al., 2012).

La chémérine est synthétisée sous la forme d'un précurseur (pro-chémérine) dont le rôle dans l'inflammation varie en fonction du type de peptides finalement formés. C'est pourquoi, il semble que la chémérine soit impliquée, selon les circonstances, dans l'initiation ou la résolution de l'inflammation (**Figure 12**). La chémérine semble également jouer un rôle direct dans l'adipogenèse. En effet, il a été montré que la chémérine est essentielle au début (pendant les 4 premiers jours) du processus de différenciation des adipocytes (Goralski et al., 2007). De plus, la chémérine joue un rôle dans le métabolisme du glucose et la sensibilité à

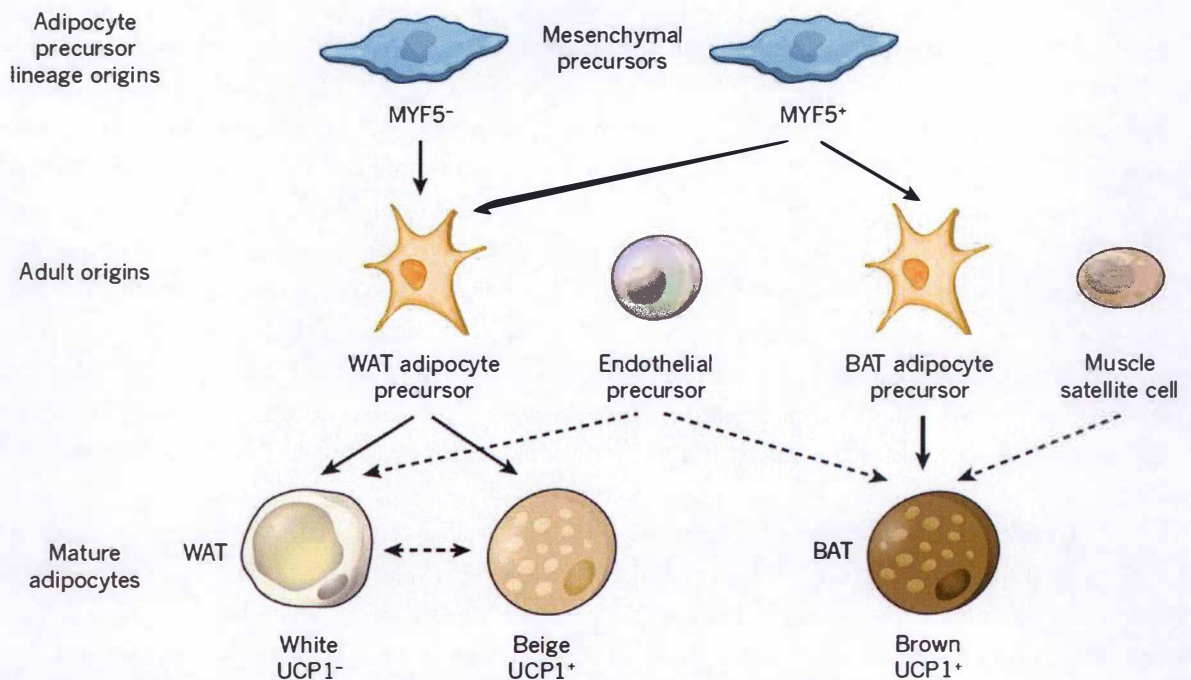


Figure 13 : Origines des adipocytes blancs, beiges et bruns (Peirce et al., 2014).

Chaque type d'adipocytes dérive de cellules précurseurs mésenchymateuses. Comme suggéré par des études de traçage de lignée cellulaire, le précurseur des adipocytes blancs dérive à la fois de la lignée MYF5⁺ et MYF5⁻ alors que les adipocytes bruns et les myocytes dérivent uniquement de la lignée MYF5⁺, originaire du mésoderme paraxial. Les pré-adipocytes sont considérés comme un type cellulaire déterminé dans leur destin de différenciation cellulaire. Au même titre que les adipocytes bruns, les adipocytes beiges sont caractérisés par l'expression de UCP-1 et un contenu en mitochondries plus important par rapport aux adipocytes blancs. Les adipocytes beiges peuvent avoir une origine commune aux adipocytes blancs ou potentiellement dériver des adipocytes blancs matures à travers un processus de trans-différenciation. L'origine endothéliale des adipocytes blancs et bruns reste controversée alors que les adipocytes bruns pourraient également dériver des cellules satellites des muscles squelettiques. A l'âge adulte, les nouveaux adipocytes sont formés à partir des pré-adipocytes.

MYF5 : *Myogenic Factor 5* ; WAT : *White Adipose Tissue* ; BAT : *Brown Adipose Tissue*, UCP1 : *Uncoupling Protein 1*.

l'insuline. En effet, la chémérine améliore l'absorption du glucose par les adipocytes 3T3-L1 (Takahashi et al., 2008) alors qu'elle induit la résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques humains (Sell et al., 2009).

Chez les sujets obèses, le niveau d'expression de la chémérine est positivement corrélé à la valeur du BMI, à la concentration en TG/TAG, à la valeur de la glycémie à jeun et à la concentration en cytokines pro-inflammatoires (Ernst et al., 2012). A l'heure actuelle, la régulation de l'expression de la chémérine dans les adipocytes par PPAR γ est encore controversée (Muruganandan et al., 2011 ; Vernochet et al., 2009). Par contre, la présence de séquences SRE (*sterol regulatory element*) dans le promoteur du gène *Rarres2* pourrait permettre au facteur de transcription SREBP2 (*Sterol regulatory element binding-protein 2*), un facteur contrôlant l'expression des gènes codant pour les enzymes de la voie de synthèse du cholestérol, d'induire l'expression de l'adipokine comme démontré dans les adipocytes 3T3-L1 et *in vivo* (Bauer et al., 2011).

Les adipokines ne sont souvent synthétisées et sécrétées qu'au cours du processus de différenciation cellulaire appelé adipogenèse. C'est ce programme de différenciation excessivement bien contrôlé que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

1.5 Adipogenèse et différenciation des adipocytes blancs

Chez l'homme, le tissu adipeux blanc commence à se développer durant la dernière phase de la gestation. Bien que l'expansion du tissu adipeux blanc soit prédominante durant la période post-natale, il semble que l'individu adulte soit capable de renouveler sa masse en adipocytes blancs à un taux d'environ 10 % par an (Spalding et al., 2013).

Plusieurs études suggèrent que les adipocytes blancs dérivent des cellules souches mésenchymateuses Myf5⁻ (*Myogenic factor 5*) (Timmons et al., 2007). Toutefois, des études plus récentes utilisant la technique de « traçage » de lignées cellulaires *in vivo* ont révélé la présence de précurseurs d'adipocytes Myf5⁺ dans le tissu adipeux blanc. Le devenir de ces cellules Myf5⁺ positives pourrait cependant correspondre à des précurseurs d'adipocytes bruns localisés dans le tissu adipeux blanc (Shan et al., 2013) (**Figure 13**).

Bien que la différenciation des adipocytes blancs soit un processus continu, elle a été divisée en 2 étapes : la *détermination* et la *différenciation terminale*. La *détermination* représente la conversion d'une cellule souche mésenchymateuse multipotente en un précurseur à « compétence adipogénique » nommé pré-adipocyte. La protéine ZFP423 (*zinc-finger protein 423*) est considérée comme un marqueur caractéristique des pré-adipocytes (Gupta et al., 2010). L'engagement vers la lignée pré-adipocytaire résulterait de la rencontre des cellules progénitrices Myf5⁻ avec les facteurs BMP2 et BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 2 et 4*) (Jin et al., 2006). Si plusieurs voies de signalisation comme la voie WNT canonique et non-canonique et la voie de signalisation du TGF β ont été décrites dans le contrôle de la détermination, la protéine PRDM16, un facteur de transcription de la famille des protéines à doigt de zinc contrôlant la différenciation des adipocytes bruns (et beiges), exercerait également un effet inhibiteur de la formation de pré-adipocytes blancs (Cristancho et Mitchell, 2011) (**Figure 14**).

La différenciation des pré-adipocytes en adipocytes nécessite une inhibition de contact entre les cellules suivie d'une reprise d'un (ou de deux) cycle(s) de division afin de lancer le

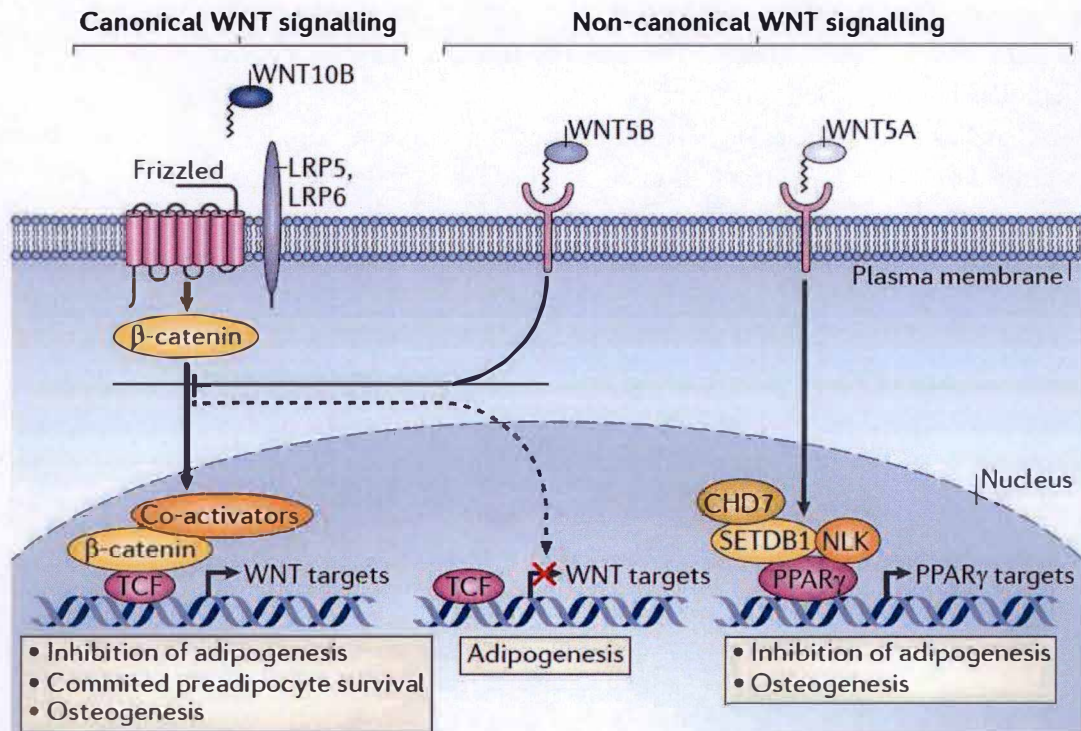


Figure 14 : La voie de signalisation WNT canonique et non canonique dans l'adipogenèse (Cristancho et Mitchell, 2011).

Le ligand WNT10B active le récepteur WNT canonique LRP5 ou LRP6 conduisant à une translocation de la β -caténine dans le noyau. Une fois dans le noyau, la β -caténine entraîne le recrutement d'un complexe co-activateur sur le facteur de transcription TCF menant à l'expression des gènes WNT impliqués dans l'inhibition de l'adipogenèse et la survie des pré-adipocytes. Les fibroblastes embryonnaires murins qui n'expriment pas le récepteur WNT canonique, LRP6, sont également capables de se différencier en adipocytes. Il est connu que la voie non canonique de signalisation contribue à l'ostéogenèse dans les cellules souches mésenchymateuses. La translocation de la β -caténine est en revanche inhibée par la voie de signalisation non canonique dépendante du ligand WNT5B. Cette dernière inhibe la translocation de la β -caténine dans le noyau des pré-adipocytes (représentée par une flèche en pointillée). Au même titre que le ligand WNT10B, le ligand WNT5A non canonique participe aussi à l'inhibition de l'adipogenèse et à la stimulation de l'ostéogenèse mais diffère dans son mécanisme transcriptionnel. Celui-ci implique l'activation de SETDB1 et la formation du complexe incluant CHD7, SETDB1 et NLK. Il en résulte une inhibition de la transcription de gènes du métabolisme cibles de PPAR γ dans la lignée cellulaire 3T3-L1.

SETDB1 : *histone methyltransferase SET Domain Bifurcated 1*; CHD7 : *Shromodomain Helicase DNA-binding*; NLK : *NEMO-like kinase*; TCF : *T-cell specific transcription factor*. LRP : *low-density lipoprotein receptor-related protein*.

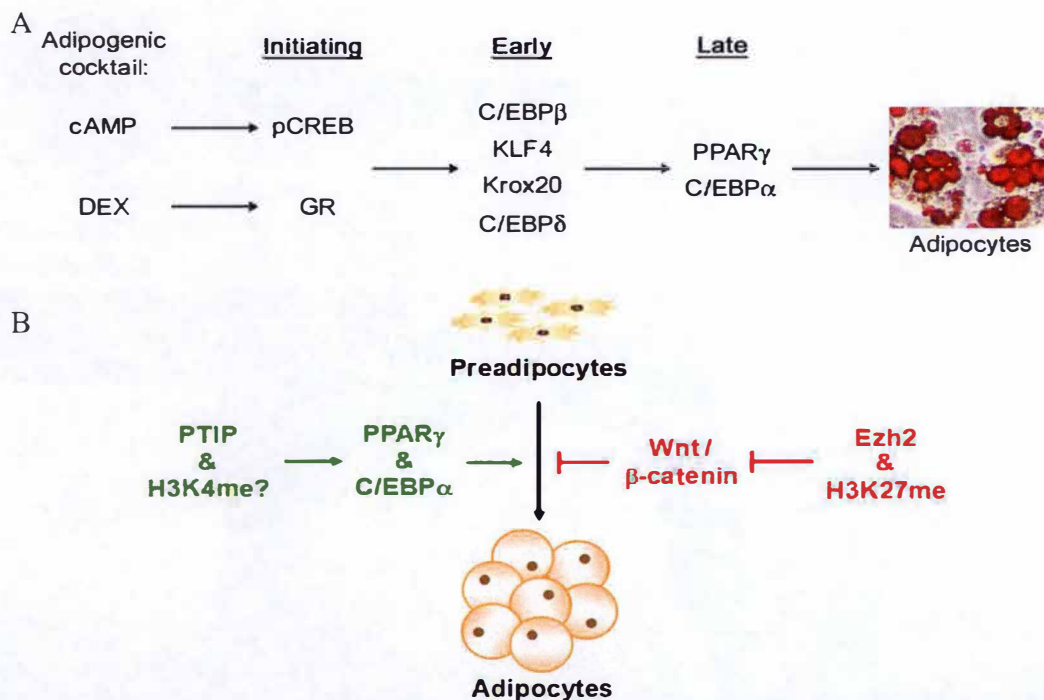
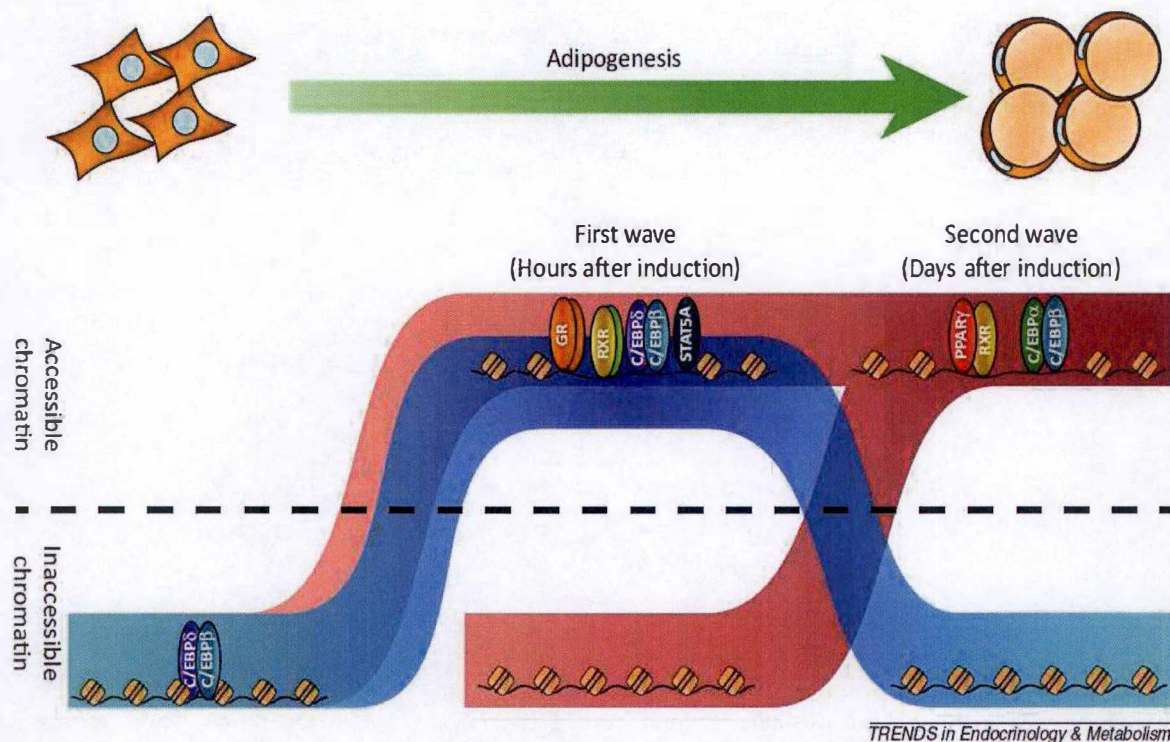


Figure 15 : Effet du cocktail pro-adipogénique sur l'activation des facteurs de transcription et sur les modifications épigénétiques au cours de l'adipogenèse (Ge, 2012).

A. Un analogue de l'AMPc présent dans le cocktail pro-adipogénique augmente la concentration en AMPc dans la cellule et active la PKA qui va activer (par phosphorylation) le facteur de transcription CREB (pCREB, forme active). pCREB agit notamment comme un activateur du facteur de transcription C/EBPβ. L'AMPc est également capable d'induire la différenciation via des voies de signalisation indépendantes de la PKA. En se liant au GR, la DEX induit l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la phase précoce de l'adipogenèse comme C/EBPβ, KLF4, Krox20 et C/EBPδ. Ces facteurs de transcription sont essentiels pour l'expression de PPARγ et de C/EBPα agissant à leur tour dans la phase tardive de l'adipogenèse et le maintien de l'état différencié. L'insuline possède une activité pro-adipogénique à travers l'expression de SREBP1c (non montré sur la figure).

B. La méthylation de H3K4 et de H3K27 sont respectivement des marques activatrices et inhibitrices de l'expression génique et interviennent dans la régulation du processus de différenciation. L'activité H3K27 méthyltransférase de la sous-unité catalytique de PRC2, Ezh2, réprime constitutivement les gènes *Wnt* et β-caténine associés à l'inhibition de l'adipogenèse, ce qui favorise la différenciation. Quant à PTIP, une protéine associée aux histones H3K4 méthyltransférases MLL3/MLL4 est impliquée dans l'expression de PPARγ et C/EBPα en augmentant la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 bien que le type de méthylation (mono, di ou tri) n'a pas encore été confirmé.

AMPc : Adenosine monophosphate cyclic ; DEX : dexamethasone ; C/EBP : CCAAT/ enhancer-binding protein, pCREB : phosphorylated cAMP-response element-binding protein ; KLF4 : Krüppel-like factor 4 ; Krox 20 ou EGR2 : early growth response 2, PPARγ, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -γ ; GR : glucocorticoid receptor ; PKA : Protein Kinase A ; PTIP : Pax2 Transactivation domain Interaction Protein. SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c ; PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2; Ezh2 : Enhancer of Zeste Homolog 2.



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 16 : Modèle des 2 vagues de facteurs de transcription durant la phase terminale de l'adipogenèse (Lefterova et al., 2014).

La première vague de facteurs de transcription induite par le cocktail pro-adipogénique est caractérisée par l'activation et le recrutement des facteurs de transcription C/EBPδ et C/EBPβ, GR, STAT5A et CREB au niveau de la chromatine. Parmi cette première vague de facteurs de transcription, C/EBPβ semble jouer un rôle régulateur majeur dans le remodelage de la chromatine en début de différenciation puisque sa liaison aux hotspots du génome induit une configuration ouverte de la chromatine. C/EBPβ est donc capable de se lier à des sites possédant une configuration d'hétérochromatine. Il en résulte l'expression d'une seconde vague de facteurs de transcription dont les principaux acteurs sont PPARγ et C/EBPα. Les facteurs de transcription de la deuxième vague contribuent à l'instauration du programme adipogénique et participent également au remodelage de la chromatine pour la rendre accessible à d'autres facteurs de transcription.

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein; GR : Glucocorticoid Receptor; STAT5A : Signal Transducer and Activation of Transcription 5A; CREB : cAMP-response element-binding protein; RXR : retinoid X receptor; PPARγ, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -γ.

programme de différenciation terminale (Green et Meuth, 1974). Nous noterons que les acteurs protéiques impliqués dans la différenciation des adipocytes ont été majoritairement étudiés *in vitro* à l'aide du modèle de pré-adipocytes murins 3T3-L1 (Green et Meuth, 1974; Lefterova et al., 2014). Un cocktail adipogénique composé de dexaméthasone, un analogue de l'AMPc non hydrolysable comme dibutyryl-AMPc ou une molécule augmentant la concentration en AMPc (3-isobutyl-1-méthylxanthine : un inhibiteur de phosphodiesterase) et l'insuline sont nécessaires, *in vitro*, afin de stimuler la conversion des pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes (**Figure 15a**) (Green et Kehinde, 1975). L'AMPc active la PKA et entraîne la répression de l'expression de Wnt10B, le principal ligand WNT associé à l'inhibition de la différenciation (Fox et al., 2008). L'insuline induit l'expression du facteur de transcription ADD1/SREBP1 participant à la régulation de la synthèse des lipides suite à l'induction de l'expression de la FAS (*Fatty Acid Synthase*). Les modifications post-traductionnelles (MPTs) comme la méthylation de l'H3K4 et de l'H3K27 jouent également un rôle dans la régulation du processus adipogénique (**Figure 15b**).

Les études portant sur la différenciation *in vitro* ont également permis d'éclaircir la dynamique des régulateurs transcriptionnels nécessaires à la différenciation terminale et ont permis d'établir un modèle comprenant deux vagues d'activation de facteurs de transcription (**Figure 16**). Suite à l'addition des facteurs pro-adipogéniques, C/EBP β semble jouer un rôle central dans le recrutement des facteurs de transcription aux hotspots du génome constituant ainsi la première vague des facteurs de transcription (Steger et al., 2010). Les « hotspots » représentent des régions génomiques occupées par de multiples facteurs de transcription dans un type cellulaire donné (Lefterova et al., 2014). L'expression de C/EBP β est médiée par la cascade JAK2 (*Janus kinase 2*)-STAT3, l'activation du facteur transcriptionnel CREB, et les facteurs KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) et KROX20 (Cristancho et Mitchell, 2011).

Membre de la seconde vague d'activation de facteurs de transcription, le récepteur nucléaire PPAR γ est nécessaire et suffisant pour que la différenciation terminale se produise *in vitro* et *in vivo*. PPAR γ existe sous 2 isoformes, PPAR γ 1 et PPAR γ 2, ce dernier étant exprimé spécifiquement dans les adipocytes (Tontonoz et al., 1994). PPAR γ coopère avec C/EBP α afin d'orchestrer le programme de différenciation, contrôlant l'expression de nombreux gènes marqueurs de l'adipogenèse de manière synergique comme Plin1 (*Perilipin1*), Lpl (*Lipoprotein Lipase*), ou encore Acs11 (*Acyl coenzyme A synthetase long-chain family member 1*) (Stahl Madsen et al., 2014). Ces deux facteurs de transcription se régulent également l'un l'autre dans un circuit de feedback-positif (Wu et al., 1999). Dans les promoteurs des gènes cibles de ces facteurs de transcription, il a été montré qu'entre 30 à 60 % des régions contenant les sites de liaison de PPAR γ sont également occupées par C/EBP α (Schmidt et al., 2011). Les sites de liaison de PPAR γ dans le génome d'adipocytes 3T3-L1 sont distribués dans les promoteurs proximaux (environ 10 %), les régions introniques et dans les régions intergéniques distales (Lefterova et al., 2014). La diminution de la viabilité cellulaire des adipocytes matures de souris suite à la délétion de PPAR γ suggère que ce régulateur intervient, tout comme C/EBP α , dans le maintien de l'état différencié des adipocytes (Imai et al., 2004).

En conclusion, l'adipogenèse, placée essentiellement sous le contrôle des facteurs de transcription comme PPAR γ et C/EBPs, permet d'aboutir à la formation d'adipocytes accumulant des TG/TAG et caractérisés par l'expression de nombreux marqueurs

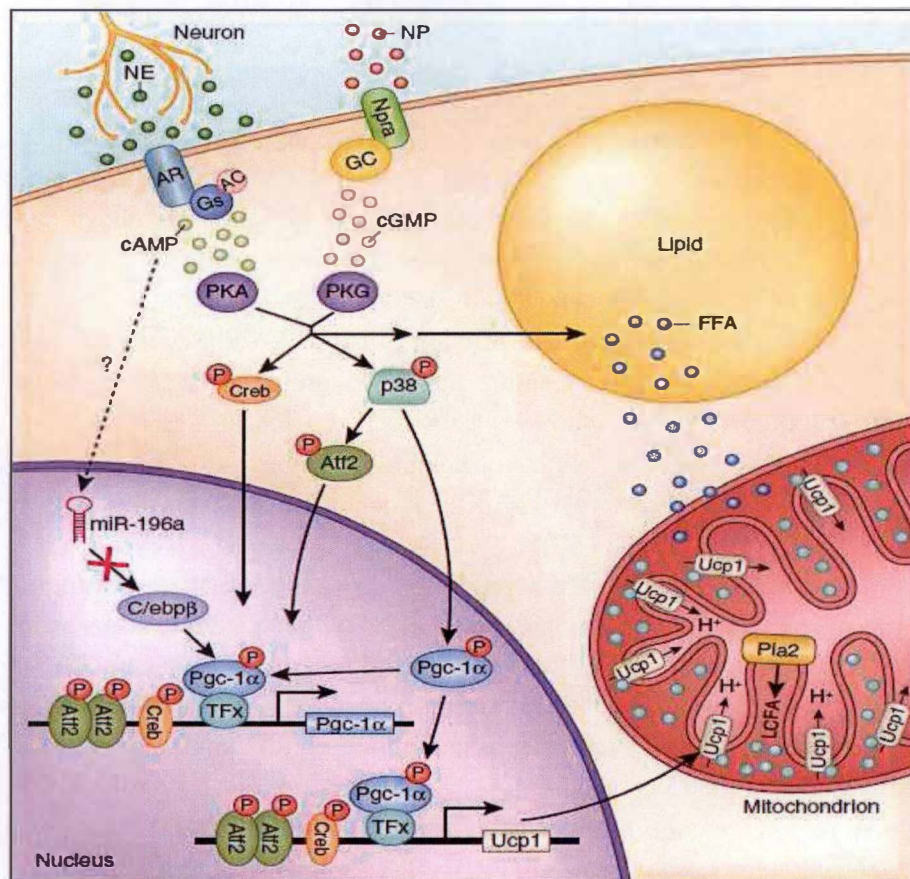


Figure 17 : Induction catécholamine et natriurétique de la thermogénèse (Harms et Seale, 2013).

La libération de catécholamine (Norépinéphrine (NE) : cercle vert foncé) par les neurones sympathiques induit une augmentation de l'activité de la PKA suite à une élévation de la concentration en AMPc dépendante de l'activation de l'AC. La liaison du NP à son récepteur Npra active la GC, laquelle induit une augmentation de l'activité de la PKG médiée par l'élévation de la concentration en GMPC. L'activation de la PKA et de la PKG résulte en une activation de p38 MAPK qui phosphoryle à son tour PGC-1 α entraînant son activation. Ce dernier interagit alors avec des facteurs de transcription (TFx) et régule l'expression de plusieurs gènes thermogéniques comme UCP-1 et son propre gène mettant en lumière le rôle considérable de PGC-1 α dans la régulation de la thermogénèse adaptative. L'activation d'Atf2 et de PGC-1 α mène à l'expression du gène Pgc-1 α . Les LCFA formés par la Pla2 au niveau de la membrane mitochondriale interne active UCP-1. Quant aux acides gras libérés par la lipolyse après activation de PKA et de PKG, ils seront oxydés dans la mitochondrie et l'énergie sera libérée sous forme de chaleur à travers UCP-1. L'augmentation de l'abondance du miR-196a en réponse à la stimulation β -adrénergique augmente l'expression de C/EBP α lequel participe également à la régulation post-transcriptionnelle de la thermogénèse adaptative. Le contrôle de l'expression du miR-196a n'est pas encore élucidé.

AR : Adrenergic Receptor; P: Phosphate; Gs : α G protein subunit; Atf2 : Activating transcription factor-2; Npra : Natriuretic peptide receptor A; GC : Guanylyl Cyclase; AC : Adenylyl Cyclase; NP : Natriuretic Peptides; PKA : Protein Kinase A; PKG : Protein Kinase G; Pla2 : Phospholipase A2; LCFA : Long Chain Fatty Acid; p38 MAPK : p38 Mitogen-Activated Protein Kinase; RXR : Retinoid X Receptors; TF : Thyroid Receptor. CREB : cAMP- Response Element-Binding Protein; PGC1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1- α ; Ucp1 : Uncoupling protein 1; FFA : free fatty acid; C/EBP : CCAAT/Enhancer-Binding Protein; AMPc : Adenosine Monophosphate cyclic; GMPC : Guanosine Monophosphate cyclic.

adipocytaires comme FABP (*Fatty-Acid Binding Protein 4*) ou FAT/CD36, un transporteur de lipides.

1.6 Tissu adipeux brun

1.6.1 Localisation et morphologie

Chez les mammifères, dont les rongeurs, la graisse brune classique est distribuée aux sites interscapulaires, axillaires, paravertébraux et/ou périrénaux (Frontini et Cinti, 2010) et est essentielle aux petits mammifères pour assurer la thermogénèse adaptative (Lidell et al., 2013). Le dépôt interscapulaire est aussi retrouvé chez l'humain bien qu'il régresse avec l'âge (Lidell et al., 2013). Cependant, très récemment, la présence de tissu adipeux brun métaboliquement actif chez l'humain adulte a été démontrée à l'aide de la tomographie à émission de positron au ^{18}F -déoxyglucose (FDG PET), une technologie basée sur l'absorption d'un dérivé de glucose marqué par un isotope radioactif du fluore (F18) non métabolisable (Nedergaard et al., 2007; Virtanen et al., 2009). Au niveau de la morphologie, les adipocytes bruns ont un diamètre plus petit que les adipocytes blancs et contiennent plusieurs vésicules lipidiques de petite dimension. L'importante abondance de mitochondries contenant des cytochromes riches en ions ferreux rouge-brunâtre est responsable de la couleur brune des adipocytes bruns.

1.6.2 Fonctions métaboliques

La principale fonction du tissu adipeux brun consiste à dissiper l'énergie contenue dans les lipides sous forme de chaleur, un processus nommé thermogénèse adaptative (Bartel et al., 2011). Afin de remplir cette fonction, le tissu adipeux brun est caractérisé par une forte expression du gène codant pour UCP-1, une protéine résidant dans la membrane mitochondriale interne et représentant plus de 10 % des protéines mitochondriales de ces cellules (Fedorenko et al., 2012; Keipert et al., 2014). Du point de vue de la mécanistique du découplage médié par l'UCP-1, Fedorenko et ses collaborateurs suggèrent que les acides gras à longues chaînes (AGLC) libérés par lipolyse et par l'activité hydrolytique de la phospholipase A2 associée à la membrane mitochondriale interne, peuvent constituer le substrat de UCP-1 et sont importants pour le transport des protons H^+ (de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale). C'est pourquoi, UCP-1 pourrait donc être considéré comme un symporteur AGLC/ H^+ (Fedorenko et al., 2012) (**Figure 17**). En condition basale, l'activité d'UCP-1 est inhibée par les nucléosides puriques di et tri-phosphates (Shabalina et al., 2010).

Ayant une large capacité d'absorption et de métabolisation du glucose et des lipides, le tissu adipeux brun tend à normaliser l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie comme l'attestent des études menées sur des modèles de souris diabétiques et souffrant de dyslipidémie (Bartel et al., 2011). En réponse à une exposition au froid (« *cold-induced thermogenesis* ») ou à un régime riche en graisses (« *diet-induced thermogenesis* »), la stimulation β -adrénergique des adipocytes bruns par les innervations sympathiques (le tissu adipeux brun est très innervé), régule la libération des acides gras (lipolyse) des vésicules lipidiques et active UCP-1. Le passage des protons de l'espace inter-membranaire par la protéine UCP-1, court-circuite la force « proton motrice » assurée par le passage de ces protons dans le complexe V (Fo-F1

ATP synthase) (Parker et al., 2009). Ce découplage entre la respiration des équivalents réducteurs provenant de l'oxydation des substrats tels que les acides gras et la production d'ATP mène à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (**Figure 17**) (Enerbäck, 2010).

1.6.3 Adipogenèse des adipocytes bruns

Le tissu adipeux brun dérive de précurseurs du mésoderme embryonnaire (jour 10,5 de l'embryogenèse) exprimant de façon transitoire MYF5⁺ et PAX7⁺ (*Paired-box 7*). Les adipocytes bruns semblent donc partager une origine commune avec les cellules musculaires squelettiques (Hondares et al., 2011). Plusieurs facteurs de transcription agissent de concert pour conduire à la différenciation des adipocytes bruns comme PPAR α , PPAR γ , FOXC2, SRC1 et PRDM16 (Hondares et al., 2011). Dans ces cellules, PPAR γ est recruté par Ebf2 (*Early B cell factor 2*), un facteur de transcription de type « hélice-boucle-hélice », pour activer l'expression de gènes menant à la transcription de PRDM16 (*PR domain zinc finger protein 16*), un complexe transcriptionnel majeur responsable du switch moléculaire vers le phénotype « adipocyte brun » au lieu du phénotype « cellule musculaire » (Seale et al., 2008). De plus, comme déjà mentionné, en interagissant avec les co-répresseurs CtBP1 et CtBP-2 (*C-terminal-binding protein-1/-2*), le complexe PRDM16 est capable de réprimer l'expression de gènes spécifiques des adipocytes blancs (Kajimura et al., 2008).

Ohno et ses collaborateurs ont récemment montré que l'inactivation de EHMT1 (*euchromatic histone-lysine N-methyltransferase1*), membre du complexe PRDM16 dans les adipocytes bruns, cause une perte du phénotype caractéristique des graisses brunes et stimule la différenciation *in vivo* en cellules musculaires (Ohno et al., 2013). Le mécanisme sous-jacent de EHMT1 impliquerait une inactivation des promoteurs des gènes spécifiques de la myogenèse suite au contrôle de la di et tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me2/3) (Ohno et al., 2013) révélant l'importance de facteurs épigénétiques au cours de la différenciation des adipocytes bruns. La fonction de PRDM16 est déterminante dans la différenciation des cellules en adipocytes bruns puisqu'en modulant l'activité de divers facteurs de transcription tels que PPAR γ , PPAR α , C/EBP β et le co-activateur PGC-1 α , PRDM16 induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la thermogenèse comme UCP-1, DIO2 (*type II iodothyronine deiodinase*) et PGC-1 α , un co-activateur essentiel de la biogenèse mitochondriale (**Figure 17**) (Seale et al., 2011).

1.7 Tissu adipeux beige

1.7.1 Localisation et morphologie

Très récemment, il a été montré que des îlots d'adipocytes retrouvés au sein du tissu adipeux blanc, essentiellement au niveau du tissu adipeux blanc inguinal (Walden et al., 2012), partagent la caractéristique de répondre à une augmentation de la concentration en AMPc en exprimant fortement le gène *Ucp-1* (Wu et al., 2012). Cette caractéristique partagée avec les adipocytes bruns est à la base de la désignation d'adipocyte beige (ou « brite » pour « brown in white »). Wu et ses collaborateurs suggèrent que le beige est un type cellulaire

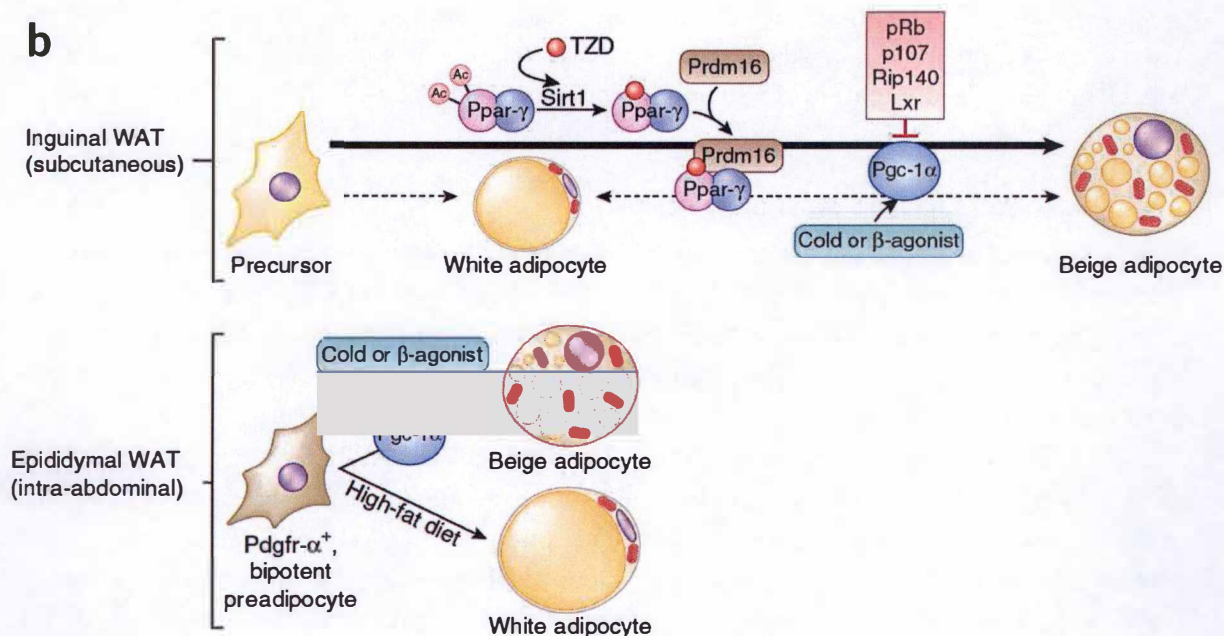


Figure 18 : Régulation de la formation des adipocytes beiges (Harms et Seale, 2013).

Les adipocytes blancs du tissu adipeux inguinal (sous-cutané) peuvent se trans-différencier en adipocytes beiges sous l'effet de stimuli comme le froid ou la stimulation β -adrénergique par des agonistes β 3-adrénergiques entraînant l'expression d'UCP-1. Cette stimulation induit l'activation de PGC-1 α , un régulateur déterminant dans la formation d'adipocytes beiges. Le facteur de transcription PGC-1 α est négativement régulé par plusieurs facteurs comme pRb, p107, Rip140 et Lxr, lesquels sont indirectement impliqués dans la thermogénèse adaptative. Bien que le mécanisme ne soit pas encore complètement élucidé, l'ajout d'agoniste de PPAR γ comme la TZD favorise la déacétylation de PPAR γ médiée par Sirt1. Cette déacétylation permet, en autres, le recrutement et la stabilisation du complexe PRDM16, un régulateur de la différenciation des cellules en adipocytes bruns. Dans le tissu adipeux blanc épидидymal (intra-abdominal), les précurseurs Pdgfr- α^+ ont la capacité de se différencier en 2 types cellulaires selon le stimulus : le régime riche en graisses induit la formation d'adipocytes blancs à travers le régulateur PGC-1 α alors que les stimulateurs β -adrénergiques sont responsables du développement d'adipocytes beiges.

TZD : Thiazolidinedione ; Ac : Acetylation ; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ; Sirt1 : Sirtuin 1 ; PRDM16 : PR Domain Containing 16 ; Pdgfr- α^+ : PlateletDerived Growth Factor Receptor- α ; Pgc-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1-alpha ; pRb ou Rb1 : Retinoblastoma 1 ; p107 ou Rbl1 : Retinoblastoma-Like 1 ; RIP140 ou Nrip1 : Nuclear Receptor Interacting Protein 1 ; Lrx ou Nr1h3 : Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 ; WAT : White Adipose Tissue.

thermogénique distinct du brun au regard de sa signature d'expression génique (Wu et al., 2012) et d'observations histologiques (Lidell et al., 2013).

Chez les rongeurs et les nouveaux-nés humains, le tissu adipeux beige est également observé dans la région supra-claviculaire. Entre la couche superficielle d'adipocytes blancs et le dépôt en profondeur d'adipocytes bruns de la nuque, se trouve un dépôt adipeux qui s'apparente phénotypiquement à du tissu adipeux beige (**Figure 18**) (Wu et al., 2012 ; Cypess et al., 2013).

1.7.2 Fonctions métaboliques

Au moyen d'une mesure de la concentration en oxygène, il a été montré que les adipocytes beiges réalisent aussi la thermogénèse non frissonnante suite à l'expression d'UCP-1 (Keipert et Jastroch, 2014). L'expression de PRDM16, caractéristique des adipocytes bruns et beiges, a été associée à l'amélioration de la tolérance au glucose et à contrecarrer la prise de poids en réponse à un régime riche en graisses (Seale et al., 2011). En revanche, Harms et Seale considèrent surestimée l'amélioration de la tolérance au glucose accordée à l'activité des adipocytes beiges. De plus, ils spéculent une modulation sur l'action de l'insuline à travers un mécanisme non thermogénique mais plutôt dépendant d'un sécrétome d'adipokines modifié par rapport aux adipocytes blancs (Harms et Seale, 2013). Cependant, à l'heure actuelle, il n'a pas encore été démontré que les adipocytes bruns et beiges possèdent des fonctions métaboliques distinctes (Rosenwald et Wolfrum, 2014).

1.7.3 Adipogenèse

L'origine des adipocytes beiges est encore fortement débattue dans la littérature. Premièrement, plusieurs études suggèrent que les adipocytes beiges ont la même origine que les adipocytes blancs, c'est-à-dire la lignée MYF5⁻ (Timmons et al., 2007). Deuxièmement, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les adipocytes beiges pouvaient également provenir de précurseurs exprimant PDGFR- α^+ (*Alpha-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) « bipotentiels » (Lee et al., 2012 ; Wang et al., 2013) (**Figure 18**), cellules capables de produire des adipocytes beiges et blancs ou encore provenir de précurseurs au destin cellulaire uniquement restreint à devenir un adipocyte beige (Wu et al., 2012).

Ajoutons encore qu'un phénomène de trans-différenciation pourrait également être à l'origine de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges suite à une stimulation β -adrénergique (Barbatelli et al., 2010). Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'*in vitro*, un traitement chronique avec un agoniste de PPAR γ (rosiglitazone) d'une culture d'adipocytes épидидymals primaires (Petrovic et al., 2010) conduit à l'apparition d'adipocytes beiges, un phénomène de trans-différenciation qui dépendrait du régulateur PRDM16 (**Figure 18**) (Ohno et al., 2013). Ce phénomène de trans-différenciation a été soutenu récemment par une étude de traçage de lignées cellulaires dans la souris transgénique (Ucp1 CreER X ROSA26-tdRFP) qui démontre une possible inter-conversion bidirectionnelle entre les adipocytes blancs et beiges en réponse au changement de température, ce qui témoignerait d'un rôle physiologique adaptatif des adipocytes blancs (Rosenwald et al., 2013).

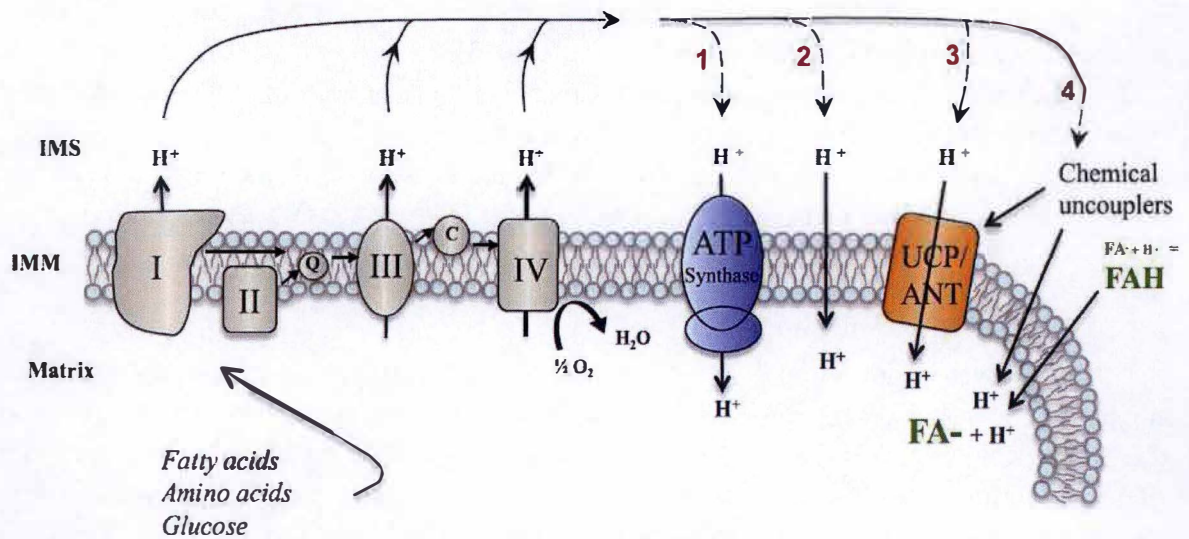


Figure 19 : Le complexe de la chaîne respiratoire dans la membrane mitochondriale interne et le découplage mitochondrial (Jastroch et al., 2013).

Dans la mitochondrie, un gradient de proton H^+ est formé de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (IMM) par les complexes de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire est composée du complexe I (I), complexe II (II), ubiquinone (Q), complexe III (III), le cytochrome C (C), complexe IV (IV) et le complexe V nommé Fo-F1 ATP synthase. Cette chaîne respiratoire utilise l'énergie stockée dans des équivalents réducteurs fournie à partir du catabolisme des acides gras, des acides aminés et du glucose. La force proton motrice générée par le gradient de protons peut être utilisée par l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP (1), être perdue suite à une fuite de protons non régulée à travers la membrane mitochondriale interne (2), ou être régulée par des canaux protéiques (UCP ou ANT) (3). Le découplage chimique est représenté en 4 avec les ions H^+ qui se lient au protonophore (FA) qui, doté de propriété lipophile, est capable de transporter les ions H^+ dans la matrice mitochondriale en traversant la membrane mitochondriale interne.

IMS : Intern Membrane Space ; UCP/ANT : Uncoupling Protein/Adenine Nucleotid Translocase.

1.8 Traitements contre l'obésité

Plusieurs préventions et traitements contre l'installation de l'obésité existent comme le suivi d'un régime alimentaire contrôlé pauvre en lipides et en hydrates de carbone et des thérapies médicales comprenant des interventions chirurgicales et médicamenteuses (Kaplan, 2005). La chirurgie bariatrique, réservée aux cas d'obésité morbide, bien que très efficace, entraîne souvent des effets secondaires comme la gastroparésie, un trouble de la vidange gastrique (Tarakji et al., 2007). A l'heure actuelle, seuls 3 médicaments ont été autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) visant soit à diminuer l'appétit en agissant sur le centre de la satiété cérébral comme la sibutramine (retirée du marché en 2010) ou la phentermine (Garvey et al., 2012), soit en diminuant l'absorption intestinale comme l'orlistat (Sumithran et Proietto, 2014). Néanmoins, l'efficacité de ces traitements est limitée à long terme (Tseng et al., 2010). Un autre traitement a été proposé récemment basé sur l'action de l'acétate au niveau de l'hypothalamus (Frost et al., 2014). Cette molécule est principalement formée dans le gros intestin à partir des fibres alimentaires, en particulier l'inuline. Le suivi de l'incorporation d'acétate par tomographie à émission de positrons révèle que l'acétate stimule principalement les neurones sécrétant la pro-opiomélanocortine (POMC) et conduit à la suppression de l'appétit (Frost et al., 2014).

Toutes ces approches thérapeutiques visent donc essentiellement à réduire la prise et l'absorption de calories (Tseng et al., 2010). Cependant, il pourrait exister d'autres méthodes de traitement. Dans le prochain paragraphe nous allons illustrer comment il est théoriquement possible de combattre l'obésité en augmentant les dépenses énergétiques cellulaires, notamment en stimulant le découplage mitochondrial.

1.8.1 Découplage mitochondrial dans les adipocytes du tissu adipeux blanc

Plusieurs arguments suggèrent que l'inhibition de la production d'ATP par les mitochondries (par induction d'un découplage mitochondrial) pourrait être utilisée en tant que nouvelle alternative aux traitements actuels contre l'obésité (Tseng et al., 2010). Le découplage mitochondrial représente la fuite de proton (H^+) de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale, sans passage par le complexe V (Fo-F1 ATP synthase) prévenant ainsi la production d'ATP (**Figure 19**). Ce processus endogène peut soit correspondre à une fuite de protons dite « basale » causée par l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne soit être physiologiquement régulé et catalysé par la protéine de découplage UCP-1 spécifiquement exprimée dans le tissu adipeux brun (Parker et al., 2009). L'effet résultant du découplage mitochondrial est une stimulation de l'activité de la chaîne respiratoire (accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène) sans production d'ATP, favorisant la diminution de l'adiposité suite à une stimulation de la β -oxydation des acides gras dans les adipocytes bruns (Vergnes et al., 2011). Ainsi, augmenter l'activité d'UCP-1 par des agonistes ou « mimer » le découplage mitochondrial par l'intermédiaire d'agents pharmacologiques dans les adipocytes blancs visant à limiter l'accumulation de TG/TAG dans ces cellules et à libérer des acides gras (suite à l'activation de la lipolyse) qui seront β -oxydés dans d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires et les adipocytes bruns pourrait s'avérer être une approche thérapeutique intéressante contre l'obésité et les maladies associées (Feldmann et al., 2009; Yoneshiro et al., 2013).

Rappelons que dans les années 30 déjà, le 2,4-dinitrophénol (DNP : un protonophore) avait déjà été utilisé en tant qu'agent de découplage pharmacologique dans le but de traiter l'obésité. Cependant, bien que très efficace, ses effets secondaires dangereux incluant l'hyperthermie conduisant à la mort essentiellement causés par son surdosage et son manque de sélectivité ont rendu son utilisation prohibée (Harper et al., 2001). Entre temps, deux autres molécules de découplage ont été mises au point : le FCCP (*carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*) et le CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*) (Jastroch et al., 2013).

Les effets d'un découplage mitochondrial dans les adipocytes blancs ont déjà été bien étudiés tant *in vitro* (Orci et al., 2004 ; Tiraby et al., 2003) qu'*in vivo* (Kopecky et al., 1995). En effet, des souris transgéniques exprimant UCP-1 dans le tissu adipeux blanc (transgène placé sous le contrôle du promoteur du gène aP2/FABP4 contrôlant spécifiquement l'expression de la protéine « *fatty acid binding protein 4* » dans les adipocytes blancs) (Seale et al., 2011) présentent un phénotype caractérisé par une diminution de la masse corporelle et une diminution de l'abondance du tissu adipeux sous-cutané en condition normophagique (Kopecky et al., 1995). *In vitro*, la sur-expression de l'UCP-1 dans des adipocytes blancs différenciés à partir de pré-adipocytes murins 3T3-L1 réduit de 30 % l'accumulation des lipides. Un phénotype expliqué par une diminution de la synthèse des acides gras plutôt que par une activation de la β -oxydation des acides gras (Si et al., 2007). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans notre laboratoire dans une étude testant l'effet d'un découplage mitochondrial modéré et chronique à l'aide de FCCP sur les 3T3-L1 (Tejerina et al., 2009). Si et ses collaborateurs suggèrent d'ailleurs que le découplage chimique médié par le FCCP conduit à des changements de flux métaboliques comparables à ceux observés par la sur-expression d'UCP-1, modifications qui impliquent une redirection du catabolisme du carbone par la glycolyse, une production de lactate et une diminution de la synthèse de lipides (Si et al., 2009).

De plus, le découplage mitochondrial induit dans les adipocytes 3T3-L1 une diminution de l'expression d'enzymes impliquées directement ou indirectement dans le métabolisme des lipides comme l'ACL (*ATP-citrate lyase*), une enzyme cytosolique qui catalyse la transformation du citrate originaire de la mitochondrie en acétyl-CoA lequel est utilisé pour la biosynthèse des lipides, du cholestérol et les réactions d'acétylation (Hatzivassiliou et al., 2005; Si et al., 2009).

Nous venons de voir dans cette introduction que le programme de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes nécessite l'activation de plusieurs voies de signalisation et l'activation de différents facteurs de transcription. De plus, le laboratoire d'accueil travaille depuis près de 10 ans sur le découplage mitochondrial dans les adipocytes et de nombreuses données ont montré que le découplage mitochondrial conduit à modifier l'expression génique, notamment de plusieurs adipokines, dans les adipocytes et induit une certaine « dédifférenciation » des adipocytes caractérisée par une perte partielle du contenu en TG/TAG (Tejerina et al., 2009 ; A. De Pauw, thèse de doctorat, 2010). Conscient de l'importance des changements épigénétiques et du remodelage de la chromatine dans le contrôle de l'expression génique et à la vue des développements récents reliant le métabolisme et l'épigénétique (Wallace et Fan, 2010), nous nous sommes donc posé la

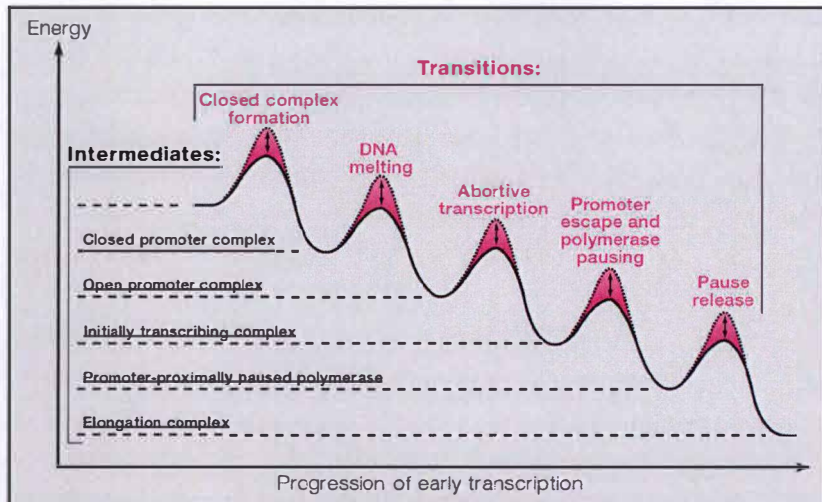
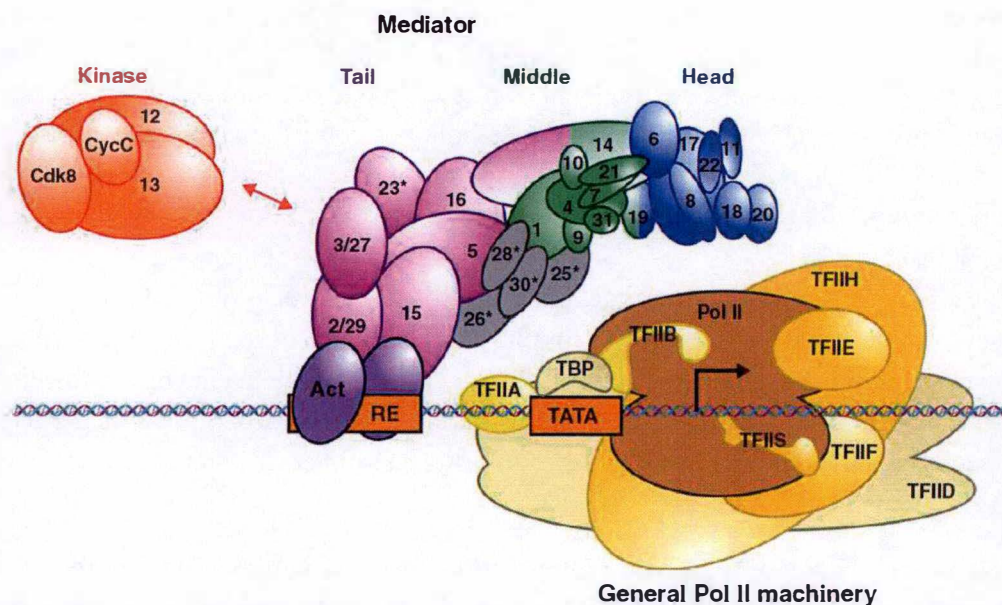


Figure 20 : Les 5 principales étapes du stade précoce de la transcription par l'ARN pol II chez les eucaryotes (Michel et Cramer, 2013).

L'axe horizontal représente la progression de la transcription au stade précoce alors que l'axe vertical correspond à l'énergie requise à chacune des transitions du stade précoce de la transcription. Les 5 étapes intermédiaires sont de (haut en bas) : le recrutement de l'ARN

pol II au promoteur, l'ouverture du complexe de pré-initiation par déshybridation de l'ADN. Le démarrage de la transcription ou transcription abortive, la pause de l'ARN pol II et l'élongation de la transcription proprement dite. Des régulateurs transcriptionnels peuvent augmenter ou diminuer le niveau d'énergie des transitions (zone rose) et conduisent à une activation ou une répression de la transcription respectivement. Ainsi, la diminution du niveau d'énergie de chaque transition du stade précoce de la transcription mène à un niveau d'expression plus élevé.



General Pol II machinery

Figure 21 : Composants du complexe de pré-initiation de l'ARN pol II (Larivière et al., 2012).

Le pont entre l'activateur (Act), lié aux éléments de régulation de l'ADN et la machinerie générale de l'ARN pol II est assuré par le médiateur (Mediator). Le large complexe médiateur est requis pour la transcription de la plupart des gènes codant pour des protéines. La machinerie générale comprend l'ARN pol II et de nombreux facteurs de transcription généraux comme TFIIA, TFIIB, TFIID/TBP, TFIIE, TFIIF et TFIIH ainsi que le facteur TFIIS. Le site d'initiation de la transcription est symbolisé par une flèche noire. Le médiateur est divisé en 4 modules : la tête, le milieu, la queue (respectivement en bleu, vert et mauve). La kinase (en orange) influence l'interaction entre le médiateur et l'ARN pol II au site d'initiation de la transcription. Les sous-unités qui sont uniquement présentes chez les eucaryotes supérieurs sont indiquées au moyen d'un astérisque. RE : DNA Response Element; TBP : TATA-Box Binding Protein, TF : Transcription Factor; Cdk : Cycline Dependant Kinase, pol II : polymerase II. Act : Activators; CycC : Cyclin C.

question de savoir si les changements d'expression de certains gènes codant pour des adipokines observés dans les adipocytes en réponse au découplage mitochondrial ne pouvaient pas être associés à des modifications épigénétiques touchant l'ADN dans les promoteurs de ces gènes. Nous allons donc maintenant poursuivre et terminer cette introduction en développant certains aspects liés à l'épigénétique et au remodelage de la chromatine en nous focalisant sur les avancées principales dans le domaine du métabolisme et de l'épigénétique obtenues pour le tissu adipeux et les adipocytes.

1.9 Epigénétique

1.9.1 Mécanismes moléculaires contrôlant la transcription

La cellule a besoin d'une modulation spatio-temporelle de son expression génique afin de réguler les différents processus comme la différenciation cellulaire, les fonctions métaboliques ou encore le maintien de la viabilité cellulaire. Une multitude d'acteurs protéiques est utilisée à cette fin. Les organismes modèles *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ont énormément contribué aux connaissances actuelles en matière de régulation de la transcription (Cheung et Cramer, 2013).

Chez les eucaryotes, les gènes sont transcrits en ARNm par l'ARN polymérase II (ARN pol II) dont le cycle de transcription est divisé en 3 étapes majeures : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Egloff et Murphy, 2008). La phase d'initiation est caractérisée par 5 stades intermédiaires (**Figure 20**). D'abord, l'ARN pol II est recrutée au niveau du promoteur du gène et s'assemble sous forme de complexe d'initiation grâce à plusieurs facteurs de transcription (TF) tels que TFIID (lequel contient notamment les protéines TBP (*TATA-box binding protein*), TFIIB, TFIIE, TFIIIF et TFIIH) (**Figure 21**) (Cheung et Cramer, 2013). La déshybridation de l'ADN par le complexe formé au niveau du promoteur correspond au 2^{ème} stade intermédiaire de l'initiation, considéré depuis peu comme un stade critique et limitant dans la régulation de la transcription (Kouzine et al., 2013). Au cours du 3^{ème} stade intermédiaire nommé transcription abortive, l'ARN pol II « pattine » et transcrit des petits ARNs (Pal et Luse, 2002). Après sa libération du promoteur (4^{ème} stade), l'ARN pol II fait une pause puis s'engage dans l'élongation de la transcription (Michel et Cramer, 2013). L'élongation de la transcription peut également être modulée par les facteurs d'élongation TFIIS et Spt4/5 (Rudd et al., 1994 ; Werner, 2012). Il est intéressant de signaler que l'élongation procédée par l'ARN pol II est rapide, entre 1 à 4 kb par minute (Ardehali et Lis, 2009). Un grand nombre de facteurs sont ensuite impliqués dans la terminaison de la transcription dont les 2 principales voies les mieux caractérisées sont dépendantes du signal poly(A) et de Sen1 (Kuehner et al., 2011). La dynamique de la transcription génique est aussi fortement influencée par des MPTs de la queue CTD (*Carboxy-terminal domain*) de l'ARN pol II servant de plateforme pour de nombreux facteurs et modulateurs de l'état de la chromatine (pour une revue récente sur le code CTD de l'ARN pol II : Drogat et Hermand, 2012). Pour que ces événements puissent se produire, il faut une configuration de la chromatine et un état de l'ADN qui soient compatibles avec ces nombreuses interactions « protéine-ADN », configuration et état qui sont contrôlés par l'épigénétique et le remodelage de la chromatine.

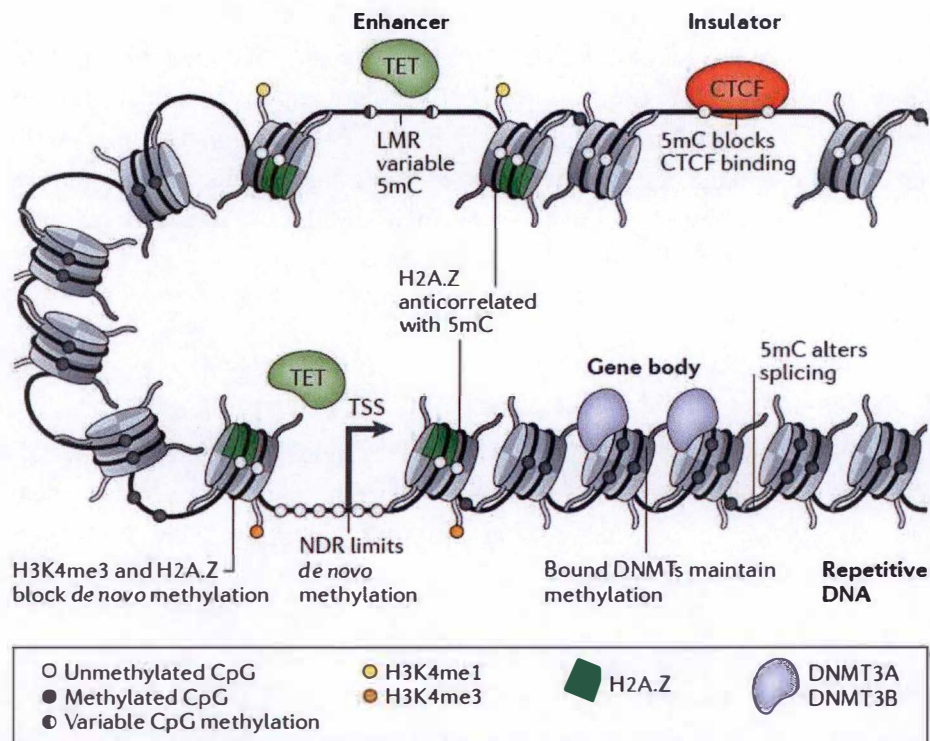


Figure 22 : Relation générale entre la distribution des sites CpG au sein de la chromatine et l'expression des gènes (Jones, 2012).

Chez l'homme, le site d'initiation de la transcription du promoteur des gènes est pauvre en nucléosomes et la méthylation *de novo* y est peu fréquente. Les TETs sont souvent associées au TSS contenant une région riche en CpG et participent à leur déméthylation en convertissant les 5mC en 5hmC, raison pour laquelle ces îlots CpG sont qualifiés de « résistants à la méthylation ». Les histones et leurs MPTs semblent aussi jouer un rôle important dans le recrutement local et l'activité des DNMTs. Au niveau du promoteur, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3), symbolisée par un cercle orange, est associée à l'activation de l'expression génique. La présence de l'histone H2A.Z s'oppose à l'action des DNMTs. Les enhancers, quant à eux, possèdent un degré variable de méthylation régulé à la fois par les DNMTs et les enzymes TETs. Les bords des enhancers sont caractérisés par la présence de la signature H3K4me1 (cercle jaune) et de l'histone H2A.Z. En amont des enhancers se trouvent des séquences nommées insulateurs, connues pour être occupées par la protéine CTCF. Cette interaction entre l'insulateur et la protéine CTCF peut contrôler l'interaction entre l'enhancer et le promoteur et par conséquent la stabilité de la machinerie de transcription. La méthylation des insulateurs peut bloquer la liaison du facteur CTCF bien que la liaison de CTCF en présence de 5-méthylcytosine a déjà été observée. Dans certains cas, il semble même que la liaison du facteur CTCF puisse induire une déméthylation locale des insulateurs. La méthylation au sein du gène, quant à elle, est induite par les *de novo* DNMTs et son influence sur l'épissage de l'ARNm a déjà été décrite.

TET : *Ten Eleven Translocation* ; TSS : *Transcription Starting Site* ; CTCF : CCCTC-binding factor; 5mC : 5 methyl cytosine; NDR : *Nucleosome Depleted Region*; LMR : *Low-Methylated Region* ; DNMT : *DNA Methyltransferase*.

1.9.2 Mécanisme épigénétique et remodelage de la chromatine

1.9.2.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation (qui résulte souvent d'un équilibre entre la méthylation et la déméthylation d'un nucléotide cible) à la position 5 de la cytosine (5-méthylcytosine, 5mC) au niveau d'un dinucléotide CG palindromique (CpG) constitue une marque épigénétique conservée dans la plupart des plantes, des animaux et des champignons (Law et Jacobsen, 2010). La méthylation de l'ADN peut être retrouvée au niveau du promoteur, des enhancers ou même à l'intérieur du gène. Environ 10 % des sites CpG sont regroupés dans le génome en régions denses, nommées îlots CpG. La notion d'îlot CpG est définie par un ratio entre le nombre de sites CpG observés/CpG attendus qui doit être supérieur à 0,65 (Takai et Jones, 2004 ; Saxonov et Berg, 2006). Les îlots CpG qui demeurent à l'état hypométhylé sont principalement localisés au niveau du site d'initiation de la transcription (TSS) des gènes à expression constitutive dit « de ménage ou de maintenance » (*house keeping gene*) et des gènes impliqués dans le développement (Deaton et Bird, 2011) (**Figure 22**). A l'inverse, les îlots CpG hyperméthylés sont généralement (mais pas toujours) associés à la répression de l'expression à long terme comme la plupart des gènes localisés sur le chromosome X inactif (Jones, 2012). La méthylation de l'ADN est généralement accompagnée de MPTs d'histones comme H3K9me2 ou H3K9me3. Des protéines comme l'EHMT2 (connus sous le nom de G9a) peuvent aussi recruter les DNMT3 résultant en une augmentation de la méthylation et à la répression de gènes pluripotents (Yamamizu et al., 2012). En revanche, la méthylation au sein d'un gène a déjà été rapportée comme une marque activatrice de la transcription (Hellman et Chess, 2007) ou associée au contrôle de l'épissage de l'ARN pré-messager (Laurent et al., 2010). En effet, ces auteurs proposent que la méthylation de l'ADN au niveau de l'exon 5 du gène codant pour CD45, une tyrosine phosphatase active sur des protéines/récepteurs transmembranaires, inhibe la liaison du facteur de transcription CTCF (*CCCTC-binding factor*) impliqué dans la pause de la transcription dépendante de l'ARN pol II. Le changement de dynamique de la transcription résultant devrait donc être défavorable au recrutement du « spliceosome » et conduire à l'inclusion de l'exon 5 dans le transcrit du gène (Shukla et al., 2011).

Il existe 2 grands types de méthylation de l'ADN : les méthylations de sites au préalable non méthylés ou méthylation « *de novo* » et l'entretien de la méthylation de sites déjà méthylés ou méthylation dite de « *maintenance* ». Ces méthylations sont catalysées par des enzymes, les enzymes DNMTs (*DNA methyltransferases*). Parmi ces enzymes, DNMT1 catalyse la méthylation de « *maintenance* » alors que DNMT3a et DNMT3b catalysent la méthylation « *de novo* », laquelle se déroule principalement entre le stade de blastocyste et le stade de l'épiblaste (70 % des sites CpG sont alors méthylés) établissant ainsi le pattern de méthylation somatique durant l'embryogenèse précoce (Okano et al., 1999). En accord avec leur fonction de méthylation *de novo*, il a été montré que les DNMT3a et DNMT3b s'associent aux brins d'ADN nouvellement synthétisés dans une des 2 cellules filles lors de la mitose. Ce mécanisme désigné comme « la ségrégation d'ADN non aléatoire » permettrait de faciliter les changements épigénétiques dans une des 2 cellules filles assurant sa différenciation future (Elabd et al., 2013). Les DNMT3 ne semblent pas avoir la capacité de reconnaître une séquence bien spécifique. L'activité de ces enzymes est notamment régulée

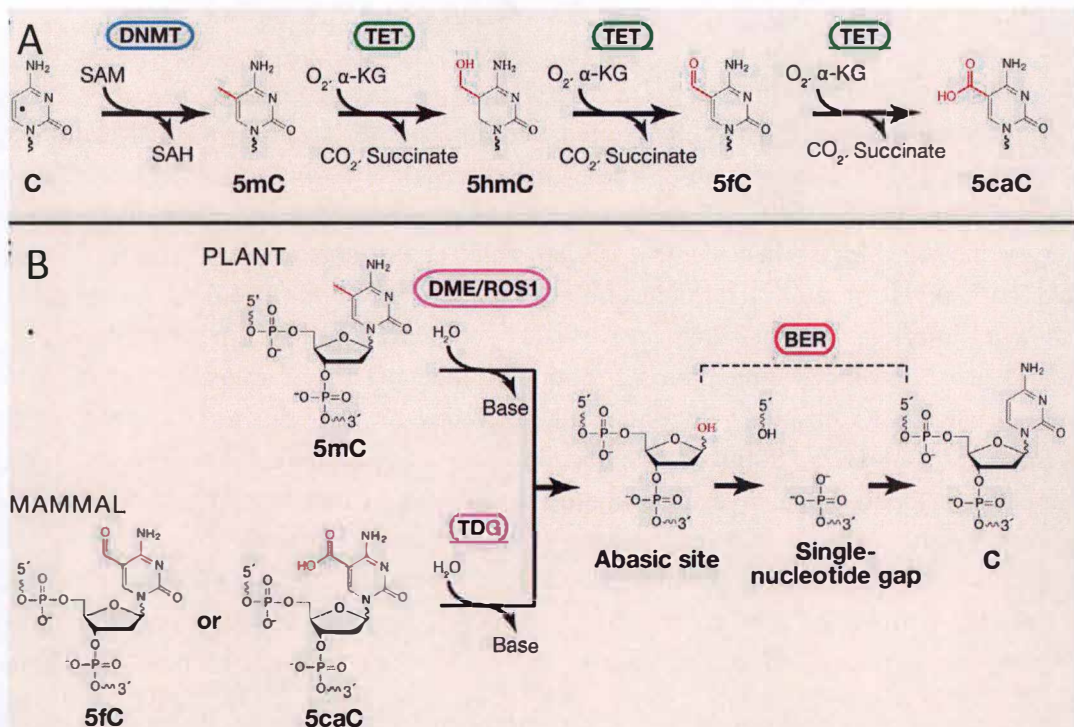


Figure 23 : Domaines et réactions catalysées par les enzymes de la machinerie de (dé)méthylation *de novo* et de maintenance chez les mammifères (Wu et Zhang, 2014).

a) La méthylation de l'ADN est catalysée par les DNMTs qui utilisent le SAM comme substrat menant à la production de SAH et à la méthylation de la cytosine (5mC). Les enzymes TETs induisent successivement des réactions d'oxygénation de la 5mC pour générer la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), la 5-formylcytosine (5fC) et la 5-carboxycytosine (5caC).

b) Chez les plantes, la glycosylase bifonctionnelle de la famille de DME/ROS1 clive le lien N-glycosidique qui lie la base azotée au pentose phosphate générant un site dit abasique (apurinique et apyrimidique). Un trou est ensuite formé dans l'ADN suite à l'activité AP lyase de DME/ROS1. Le groupe phosphate en position 3' du sucre est ensuite clivé par une activité AP endonucléase. Le retrait du nucléotide est ensuite comblé par un autre nucléotide dans une réaction catalysée par l'ADN polymérase et une activité ligase. Chez les mammifères, la cytosine modifiée (5fC ou 5caC) est excisée par l'enzyme TDG, une DNA glycosylase monofonctionnelle. Suite à l'absence du caractère bifonctionnel, l'activité AP lyase doit provenir d'une autre enzyme encore non identifiée pour obtenir un retrait complet d'un nucléotide de l'ADN et permettre l'action de BER (*base excision repair*), la machinerie de réparation de l'ADN.

DNMT : DNA Methyltransferase; TET : Ten Eleven Translocation; DME/ROS1 : Demeter/Repressor Of Silencing 1; BER : Base Excision Repair; TDG : Thymine DNA Glycosylase. SAM : S-Adenosyl Methionine; SAH : S-Adenosyl Homocysteine. α-KG : α-ketoglutarate; C : cytosine.

par des MPTs. Alors que l'on pensait que la sumoylation constituait la seule MPT des DNMT3 (Ling et al., 2004 ; Kang et al., 2001), la phosphorylation du domaine PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) de la DNMT3a a récemment été rapportée comme une MPT inversement corrélée à l'activité de la DNMT3a (Deplus et al., 2014). La sumoylation, quant à elle, s'oppose à l'interaction entre la DNMT3 et les histones déacétylases ce qui diminue la capacité de la DNMT3a à induire une répression transcriptionnelle (Ling et al., 2004). Au-delà des MPTs, l'état de la chromatine, en tant que « substrat » des DNMT3, joue également un rôle important dans le ciblage de ces DNMTs au niveau du site à méthyliser. Ainsi, Ooi et ses collaborateurs ont montré que la DNMT3L, un co-facteur de DNMT3a, reconnaît la lysine 4 non méthylée de l'histone 3 (H3K4) comme un signal pour diriger et adresser la DNMT3a au site à marquer de la méthylation (Ooi et al., 2007).

La méthylation de « *maintenance* », quant à elle, est assurée par la DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*) dont le co-facteur, UHRF1 (*ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain 1*) (Bostick et al., 2007), permet à la machinerie de maintenance DNMT1/UHRF1 de reconnaître les sites hémiméthylés et de restaurer le pattern de méthylation du brin d'ADN fils durant la mitose (Sharif et al., 2007). La DNMT1 est exprimée durant la phase S du cycle cellulaire, un profil d'expression compatible avec la fonction de maintenance de la méthylation de l'ADN (Robertson et al., 2000 ; Kishikawa et al., 2003). Au niveau structural, la DNMT1 possède un domaine zinc nommé CXXC, un domaine très fréquemment retrouvé dans les protéines associées à la chromatine et responsable de la reconnaissance des séquences riches en CpG non modifié. Il est cependant important de souligner que la DNMT3a et la DNMT3b peuvent aussi participer à la méthylation de maintenance (Jones et Liang, 2009). De plus, il est important de signaler que le maintien de la viabilité embryonnaire et néonatale requiert la présence des 3 DNMTs (Li et al., 1992).

La méthylation de l'ADN repose sur un équilibre dynamique entre la méthylation et la déméthylation impliquant plusieurs ADN déméthylases dont les enzymes TET (*Ten-Eleven Translocation*) (Tahiliani et al., 2009), AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) (Bhutani et al., 2010) et TDG (*thymine DNA glycosylase*) (**Figure 23**) (Cotellino et al., 2011). Dans ce document, nous n'aborderons que le rôle des enzymes TETs dont le rôle de déméthylation de l'ADN a récemment été investigué dans le cadre de l'adipogenèse des adipocytes 3T3-L1 (Fujiki et al., 2014). Le lecteur intéressé par les fonctions de AIDs ou TDGs pourra cependant consulter cette revue récente (Kohli et Zhang, 2013).

Une vague de déméthylation est observée lors de la spécification des cellules germinales et durant l'embryogenèse pré-implantatoire, deux stades du développement important en terme de modulation de l'état de méthylation de l'ADN. Chez les mammifères, les 3 enzymes TET, TET1, TET2 et TET3 font partie de la famille des dioxygénases dépendantes d'ions Fe^{2+} et d'oxoglutarate (Loenarz et al., 2011). Ces enzymes TETs catalysent successivement l'oxydation des 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxycytosine (5caC) (Tahiliani et al., 2009) (**Figure 23**).

Bien qu'il soit admis que la marque 5hmC mène à l'inhibition du recrutement des protéines MBD (*Methyl CpG-binding protein*) associées à la répression transcriptionnelle (Valinluck et al., 2004), on sait maintenant que MECP2, une protéine MBD, peut reconnaître

tant les 5mC que les 5hmC, soulignant la complexité de l'effet de l'hydroxyméthylation sur le contrôle de l'expression génique (Mellen et al., 2012).

Au même titre que les DNMT1, TET1 et TET3 sont caractérisées par la présence d'un domaine CXXC (NH₂-terminal) impliqué dans la reconnaissance des sites CpG non modifiés *in vitro* (Long et al., 2013). A contrario, des analyses biochimiques indiquent que TET1 peut avoir pour cible des cytosines méthylées (Xu et al., 2011) alors que TET3 pourrait reconnaître des sites non-méthylés non restreints au dinucléotide CpG (Xu et al., 2012).

Au niveau mécanistique, les enzymes TETs interviennent dans la déméthylation de l'ADN par plusieurs procédés actifs ou passifs comme celui de la déméthylation passive dépendant de la réplication. Bien que l'efficacité de reconnaissance du site CpG hémihydroxyméthylé par UHRF1 soit encore controversée (Frauer et al., 2011 ; Hashimoto et al., 2012), il a clairement été établi *in vitro* que l'activité de la DNMT1 diminue (jusqu'à 60 %) une fois que le site CpG méthylé est hydroxylé par les enzymes TET (Hashimoto et al., 2012). Ce résultat révèle un probable blocage de la méthylation de maintenance médiée par l'hydroxylation et une dilution de la base 5mC oxydée suite aux divisions cellulaires. Il est important de signaler que les DNMT3a/3b conservent leur activité méthyltransférase que le site CpG soit hémiméthylé ou hémihydroxyméthylé (Hashimoto et al., 2012).

Parmi les procédés de déméthylation actifs, la réparation de l'excision d'une base a été amplement étudiée. En effet, le mismatch 5fC:G et 5caC:G est reconnu et excisé par l'enzyme TDG, l'excision est ensuite réparée par la machinerie BER (*base excision repair*) avec une cytosine non modifiée (Zhu, 2009) (**Figure 23**). La décarboxylation de 5caC constitue le deuxième procédé de déméthylation actif bien que le mécanisme catalytique en jeu reste à identifier (Schiesser et al., 2012). De plus, une étude récente étend les procédés actifs de déméthylation aux « *de novo* DNMTs » en montrant que ces dernières possèdent aussi une activité 5-déhydroxyméthylase en conditions oxydantes (Chen et al., 2012).

1.9.2.2 Remodelage de la chromatine et modifications post-traductionnelles des histones

Bien que nous n'aborderons pas l'aspect du remodelage de la chromatine dans la partie expérimentale de ce travail, nous allons poursuivre cette introduction en donnant quelques considérations générales sur l'importance de ces changements dans le contrôle de l'expression de gènes.

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est présent sous la forme de chromatine dont l'unité de base correspond au nucléosome, lequel est composé d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) enroulé par l'ADN génomique (ADNg) sur 147 paires de base. La chromatine possède 2 rôles principaux : la compaction de l'ADN au sein du noyau cellulaire (jusqu'à 20.000 fois) et la régulation de l'expression génique (Zentner et Henikoff, 2013). La régulation dynamique de la composition des nucléosomes est à la base de la régulation génétique et inclut le remplacement des histones par des variants d'histones (Talbert et Henikoff, 2010), les MPTs (Zentner et Henikoff, 2013) et le turnover des histones par des enzymes de remodelage dépendantes de l'ATP (Hargreaves et Crabtree, 2011). Dans ce paragraphe, seules les MPTs présentes sur la queue N-terminale des histones, plus accessibles aux enzymes de modification, seront abordées. En effet, l'approche de *ChIP on Chip* a permis d'identifier différentes MPTs dont les mieux caractérisées à ce jour sont l'acétylation, la

Chromatin Modifications	Residues Modified	Functions Regulated
Acetylation	K-ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Methylation (lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Repair
Methylation (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R > Cit	Transcription
Proline Isomerization	P-cis > P-trans	Transcription

Tableau 1 : Principales modifications post-traductionnelles des histones et fonctions associées (Kouzarides, 2007).

Différents types d'acides aminés dans la séquence des histones peuvent subir une MPT. La lysine (K) peut être acétylée, mono-, di ou tri-méthylée, sumoylée ou encore ubiquitinylée. L'arginine (R) peut être mono-méthylée ou di-méthylée de manière symétrique (me2s) ou asymétrique (me2a). L'arginine peut aussi être convertie en citrulline (Cit) par déimination. La sérine (S), la thréonine (T) peuvent, quant à elles, être phosphorylées. L'acide glutamique (E) peut être ADP ribosylé. L'isomérisation cis-trans de la proline (P) peut aussi avoir lieu. Le processus biologique dans lequel intervient la MPT considérée est indiquée dans la colonne de droite.

méthylation et la phosphorylation (**Tableau 1**). L'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la déimination et l'isomérisation ne seront pas décrites mais leurs fonctions sont également présentées dans le **Tableau 1**.

L'acétylation des lysines de l'histone H4 et H3 est catalysée par les enzymes HATs (*histone acétyltransférases*) telles que GNAT, MYST ou CBP/p300 (Stern et Berger, 2000). Cette acétylation permet de neutraliser la charge positive de la lysine et altère l'interaction entre l'ADN et les histones menant ainsi à une configuration plus ouverte de la chromatine connue sous le nom « d'euchromatine » (Hong et al., 1993 ; Megee et al., 1995). Par ailleurs, l'état condensé de la chromatine, « l'hétérochromatine » constitutive (15 à 25 % de la chromatine des mammifères), localisée principalement au niveau des séquences répétées (séquences centromériques et télomériques) est associée à un faible niveau d'acétylation des histones. L'euchromatine rend accessible l'ADN à la machinerie de transcription lui permettant de s'installer sur l'ADN et d'activer la transcription. De plus, l'acétylation des histones a récemment été associée à la réplication de l'ADN (Unnikrishnan et al., 2010) et au processus de réparation des cassures double brin de l'ADN (Murr et al., 2006). Les lysines acétylées peuvent être reconnues par des protéines de remodelage de la chromatine caractérisées par la présence d'un bromodomaine initialement découvert chez l'organisme *Drosophila melanogaster* (Tamkun et al., 1992). Notons que la demi-vie de l'acétylation est souvent relativement courte, de l'ordre de la minute, suite à un turnover régulé par les HDACs (*histones déacétylases*) (Jackson et al., 1975).

La lysine des histones peut être méthylée, di-méthylées (me2) ou tri-méthylées (me3). Bien qu'il soit assez difficile de prédire les effets de ces changements sur le niveau d'expression d'un gène donné en raison du « code épigénétique » complexe et des modifications combinatoires (Chen et Dent, 2014), plusieurs marques de méthylation sur la lysine des histones ont été investiguées dans le cadre de la régulation de l'expression génique comme la monométhylation de la lysine 20 de l'histone 4 et l'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 qui sont associées à l'activation de la transcription alors que la di ou la triméthylation de la lysine 9 ou 27 de l'histone 3 induisent une répression de l'expression (Sugii et Evans, 2011). Les HMETs (*histones méthyltransférases*) diffèrent également des HATs par leur haute spécificité envers l'acide aminé à modifier. Une autre fonction de l'H3K36me est la suppression de l'initiation de la transcription au sein de la séquence codante suite à la présence de sites d'initiation cryptiques (Carrozza et al., 2005). Par ailleurs, Smallwood et ses collaborateurs ont montré que la méthylation de H3K9, une modification associée à l'hétérochromatine, recrute la DNMT1 (par l'intermédiaire de la protéine HP1) qui conduit à une méthylation de l'ADN. Ainsi, l'interaction entre HP1 et DNMT1 révèle un moyen de coopération entre histone et ADN méthyltransférase (Smallwood et al., 2007).

La phosphorylation, au même titre que l'acétylation inhibe le contact entre l'ADN et les histones suite à l'apport de charges négatives aux résidus sérine ou thréonine. La phosphorylation est une MPT que l'on retrouve plus fréquemment dans le domaine globulaire. Comme les méthyltransférases, les kinases sont spécifiques dans la reconnaissance du résidu de l'histone à phosphoryler. La phosphorylation de l'histone variant γ H2A.X par l'ATM ou l'ATR kinase est connue pour assurer le recrutement de la machinerie de réparation des cassures double brin de l'ADN (Paull et al., 2000). La phosphorylation de la sérine située à

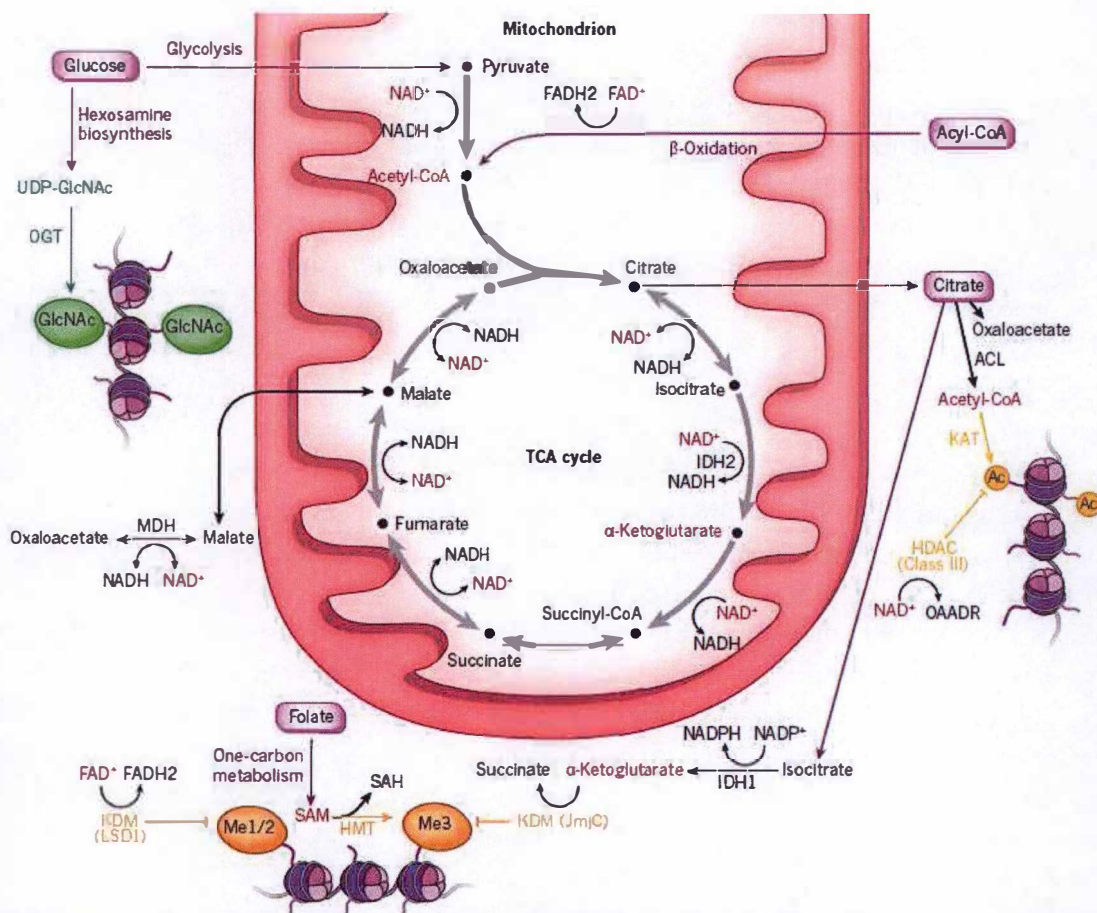


Figure 24 : Relation entre l'activité mitochondriale, le métabolisme et les modifications épigénétiques (Gut et Verdin, 2013).

Plusieurs métabolites intégrés dans diverses voies métaboliques participent à la régulation des modifications épigénétiques au niveau des histones. Des métabolites comme l'acétyl-CoA sont formés et utilisés par les enzymes de modification de l'épigénétique. Suite à un apport énergétique, l'acétyl-CoA est formé par l'oxydation du pyruvate catalysée par la pyruvate déshydrogénase au niveau de la mitochondrie. De plus, après épuisement du stock de glycogène suite au jeûne, la β-oxydation est activée et génère également de l'acétyl-CoA qui sera dirigé vers le cycle de Krebs et la synthèse d'ATP. En cas d'excès, l'acétyl-CoA est alors exporté de la mitochondrie sous forme de citrate, lequel pourra être converti en acétyl-CoA et en oxaloacétate par l'ACL. Cet acétyl-CoA sera ensuite dirigé vers la lipogenèse, la synthèse du cholestérol et d'acides aminés (non montré sur la figure) ou utilisé par les KATs pour réguler l'acétylation de protéines et des histones. Quand la concentration en glucose est importante, approximativement 5 % du fructose-6-phosphate, un métabolite de la glycolyse, est dirigé vers la voie de biosynthèse de l'hexosamine, une branche métabolique alternative du métabolisme du glucose. Il en résulte une production d'UDP-GlcNAc qui sera utilisé comme substrat par l'enzyme OGT pour greffer un groupement *N*-acétylglucosamine (vert) aux histones H2B. Le métabolisme à un carbone intègre le folate sous forme de N-5 méthyltétrahydrofolate pour générer du SAM, le donneur du groupement méthyle nécessaire à la méthylation de l'ADN ou des histones (orange). Les co-enzymes et leur ratio forme oxydée/forme réduite peuvent aussi influencer l'activité de certaines enzymes de modification de la chromatine comme la LSD1, une histone déméthylase, ou la HDAC de classe III. Les métabolites ou les régulateurs métaboliques impliqués dans la régulation des enzymes de la modification de la chromatine sont en rouge. L'activité enzymatique de plusieurs enzymes de modification de l'épigénétique peut également dépendre d'un métabolite du cycle de Krebs, l'α-cétoglutarate, comme la lysine méthyltransférase JmJc ou les enzymes TETs (non montrées). Le succinate et le fumarate, 2 métabolites du cycle de Krebs peuvent également inhiber de telles enzymes. Enfin, le ratio $NAD^+/NADH$ mitochondrial est régulé par la navette malate-aspartate qui permet une importation indirecte de l'énergie réductrice du cytosol vers la mitochondrie pour être oxydée dans la chaîne respiratoire. Ce ratio peut indirectement affecter les modifications épigénétiques. ACL : ATP-Citrate Lyase ; JmJc : Jumonji de classe C ; HMT : Histone Méthyltransferase ; HDAC : histone deacetylase ; SAM : S-adenosylmethionine ; SAH : S-adenosylhomocysteine ; OGT : O-linked N-acetylglucosamine Transferase ; UDP-GlcNAc : Uridine Diphosphate N-acetylglucosamine ; MDH : Malate deshydrogenase ; KDM : Lysine demethylase ; LSD1 : Histone Demethylase SWIRM1 ; IDH1 et IDH2 : Isocitrate Dehydrogenase Isoforms 1 and 2 ; KAT : Lysine Acetyl Transferase ; Me1/2 : mono ou dimethylation ; Me3 : trimethylation ; FAD : Flavin Adenine Dinucleotide ; OAADR : O-acetyl ADP-ribose ; UDP : Uridine Diphosphate. TCA : Tricarboxylic acid.

proximité d'une lysine méthylée peut aussi altérer le recrutement comme HP1 associée au silençage de l'expression du gène.

Notons que d'autres MPTs ont été identifiées telles que l'acylation de la lysine, la crotonylation, la formylation, la succinylation, la malonylation, la propionylation et la butyrylation (Tan et al., 2011). Cependant, les fonctions associées à ces modifications ne sont pas encore clairement identifiées et requièrent des études supplémentaires.

1.10 Influence du métabolisme sur l'épigénétique

Il est important de souligner que de nombreuses enzymes modifiant l'état de la chromatine dépendent de substrats (ou de co-facteurs) provenant du métabolisme intermédiaire. Les concentrations de ces métabolites varient en fonction des besoins et de la disponibilité énergétique de la cellule, ce qui peut mener à des changements dans la structure de la chromatine et, par conséquent à des modifications d'expression de certains gènes, en relation avec le métabolisme de la cellule (Wallace et Fan, 2010).

Illustrons maintenant les liens entre le métabolisme et le remodelage de la chromatine par quelques exemples. Le substrat des HATs est l'acétyl-CoA (Takahashi et al., 2006), un métabolite produit par l'oxydation partielle du glucose ou la β -oxydation des acides gras qui sera oxydé dans le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA, dérivé du glucose, est formé par l'ATP-citrate lyase à partir du citrate originaire de la mitochondrie. Le citrate étant capable de sortir de la mitochondrie, le pool d'acétyl-CoA cytosolique peut alors être utilisé par les HATs pour acétyler les histones au niveau des gènes impliqués dans des processus anaboliques tels que la lipogenèse ou l'adipogenèse (Wellen et al., 2009). Un autre exemple de connexion entre le métabolisme et le remodelage de la chromatine est illustré par les enzymes SIRTs (*Sirtuines*). Les sirtuines sont des HDACs qui consomment le co-facteur NAD^+ pour catalyser la réaction de désacétylation des histones (**Figure 24**) (Cohen et al., 2004). Par ailleurs, la concentration en NAD^+ , fonction de l'état énergétique de la cellule, diminue au cours du vieillissement et varie selon un rythme circadien dépendant de l'activité de la NAMPT (*nicotinamide phosphorybosyltransférase*, une enzyme de la synthèse du NAD^+), une fluctuation corrélée à l'activité enzymatique de SIRT1 (Nakahata et al., 2008).

Concernant la régulation de la méthylation des histones et de l'ADN, les HMETs, (Teperino et al., 2010) et les DNMTs, utilisent le S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur universel de groupements méthyles, synthétisé à partir de la méthionine et d'ATP dans une voie métabolique cyclique nommée « métabolisme à un carbone ». Le folate fait également partie intégrante de cette voie sous forme N^5 -méthyltétrahydrofolate (**Figure 24**).

Le FAD^+ (*flavin adenine dinucleotide*) est également utilisé comme substrat par l'histone déméthylase LSD1 (*lysine specific demethylase 1*) (Forneris et al., 2005) ce qui fait de la LSD1 une des seules protéines nucléaires à utiliser le FAD^+ pour méthyler des protéines comme p53, STAT3 ou la DNMT1 (Wang et al., 2009). L'analyse de la localisation de la LSD1 dans les adipocytes en différenciation révèle une localisation préférentielle au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la dépense en énergie et présentant la marque activatrice H3K4 diméthylée ou triméthylée. LSD1 mène à la déméthylation de l'H3K4 menant à une répression de gènes cibles comme PGC-1 α , FATP1, ATGL ou encore PDK4 (Wang et al., 2009).

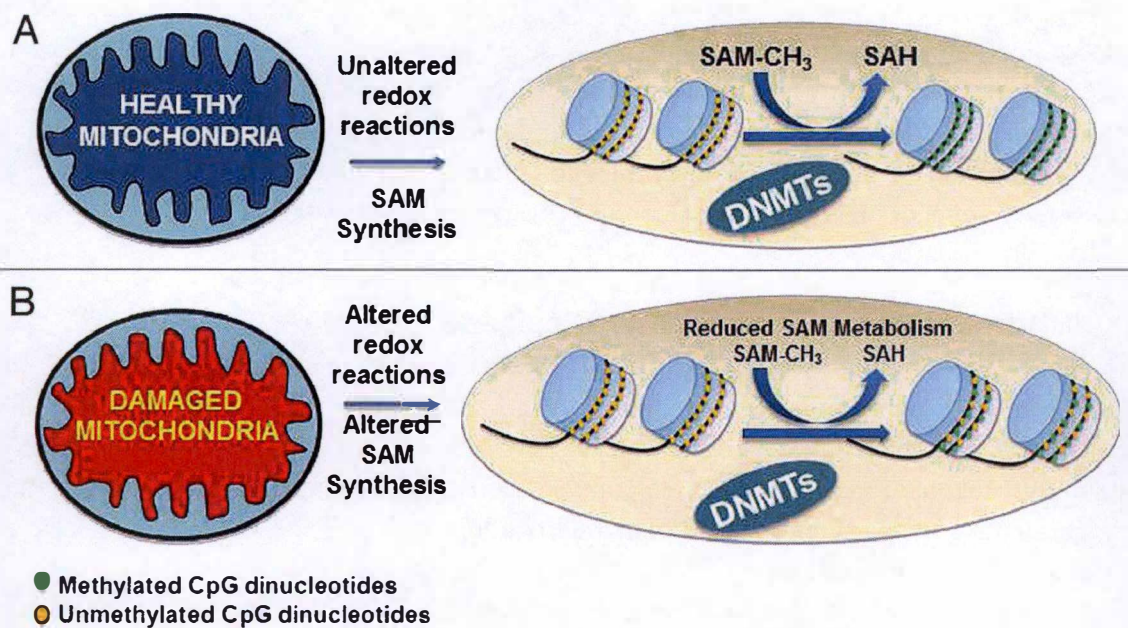


Figure 25 : Implication du fonctionnement de la mitochondrie sur la synthèse de SAM et la méthylation de l'ADN (Minocherhomji et al., 2012).

a) L'activité de la mitochondrie est favorable à la biosynthèse du SAM permettant un maintien de la méthylation des CpG hyperméthylés (vert) au niveau du génome nucléaire.

b) Un dysfonctionnement mitochondrial peut induire une perturbation des réactions rédox au sein de la mitochondrie. Ainsi, une altération de l'O₂PHOS médiée par un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺. La sérine est importante dans la synthèse du SAM puisqu'elle donne l'unité carbone activée au SAH pour former le SAM. La synthèse de la sérine dans la mitochondrie étant dépendante du NAD⁺, une altération de l'O₂PHOS peut engendrer une réduction de la production de SAM. De plus la synthèse de SAM requiert également de l'ATP. Cette diminution de la concentration en SAM conduit à une diminution de la méthylation de CpG normalement hyperméthylés (jaune).

SAM : *S*-adenosylmethionine ; SAH : *S*-adenosylhomocysteine; DNMT : *DNA* méthyltransférase;

Les enzymes JMJs (*Jumonji class*) (Loenarz et al., 2008) et TETs requièrent, quant à elles, la présence d' α -cétoglutarate comme co-facteur (Tahiliani et al., 2009). L' α -cétoglutarate est un intermédiaire du cycle de Krebs généré par la désamination oxydative de la glutamine par la glutaminase (Metallo et al., 2012). En revanche, l'activité des TETs est inhibée par le fumarate et le succinate, deux métabolites intermédiaires du cycle de Krebs (Xiao et al., 2012). Ainsi, la mitochondrie, de par son implication dans le métabolisme cellulaire, peut jouer un rôle majeur dans la régulation transcriptionnelle de l'expression génique à travers les changements de concentration en métabolites intermédiaires et en co-facteurs.

Le dysfonctionnement mitochondrial a d'ailleurs déjà été étudié dans le cadre des changements de méthylation de l'ADN. Par exemple, une déplétion du génome mitochondrial (ADNmt) peut mener à une perturbation du *pattern* de méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG observés dans des cellules d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome (cellules rho⁰) par rapport aux cellules sauvages (Smiraglia et al., 2008). De même, des changements de l'état rédox résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial peuvent altérer la synthèse de SAM (**Figure 25**). La structure de la chromatine peut également être modifiée (directement ou indirectement) par des enzymes dont l'activité est modifiée par le métabolisme cellulaire. Par exemple, l'AMPK, localisée dans le cytosol, est bien connue pour son rôle majeur de senseur énergétique et est activée en réponse à une augmentation du ratio [AMP]/[ATP] (Park et al., 2002). De manière intéressante, l'AMPK est également capable de moduler la structure de la chromatine en phosphorylant directement la sérine 36 de l'histone H2B au niveau des gènes impliqués dans l'adaptation au stress métabolique (Bungard et al., 2010). Un autre exemple est illustré par la NNMT (*nicotinamide N-methyltransférase*) qui utilise le SAM pour méthyler la nicotinamide, un précurseur dans la synthèse de NAD⁺ (Aksoy et al., 1994). Kraus et ses collaborateurs ont révélé une augmentation de l'expression de la NNMT dans le tissu adipeux blanc dans des modèles de souris obèses (*ob/ob*) et résistantes à l'insuline (*db/db*) (Kraus et al., 2014). Ce phénotype est également corrélé à l'expression de RBP4 (*retinol binding protein 4*), une adipokine impliquée dans la résistance à l'insuline des muscles squelettiques (Yang et al., 2005). L'augmentation de la concentration en NAD⁺ et du ratio de SAM/SAH induit par le knock-down de NNMT dans les adipocytes 3T3-L1 suggère que la NNMT représente un régulateur important du métabolisme énergétique et contribue aux modifications épigénétiques comme la méthylation de l'H3K4 ou éventuellement à la méthylation de l'ADN dans les adipocytes (Kraus et al., 2014).

Toutes ces données montrent que de nombreuses enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques et le remodelage de la chromatine dépendent du métabolisme énergétique (glycolyse et OXPHOS) et de l'état rédox de la cellule.

2 Objectifs du mémoire

Ce mémoire s'intègre dans un projet dédié à l'étude des effets d'un découplage mitochondrial (chronique mais modéré induit par le protonophore FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone)) dans des adipocytes blancs murins 3T3-L1.

Alors que les médicaments anti-obésité ont montré ces dernières années leur limite en terme d'efficacité, l'induction d'un découplage mitochondrial contrôlé et ciblé sur le tissu adipeux blanc, assorti d'une stimulation de la β -oxydation (dans d'autres tissus que le tissu adipeux blanc) des acides gras libérés suite à l'activation de la lipolyse dans ces conditions (Tejerina et al., 2009), a été proposée comme un moyen thérapeutique potentiel pour lutter contre l'obésité et le syndrome métabolique associé (Tseng et al., 2010). Le bénéfice pourrait être que, dans ces conditions, l'hypertrophie des adipocytes soit contrôlée, ce qui devrait améliorer les changements d'expression génique et plus spécialement rétablir une balance adéquate des adipokines, molécules de communication entre les organes qui pourraient être responsables des effets phénotypiques associés au syndrome métabolique comme la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'hypertension,

Cependant, l'effet d'un stress métabolique tel que le découplage mitochondrial sur la fonction endocrine des adipocytes est encore peu connu. Des analyses préliminaires obtenues au laboratoire révèlent des diminutions très fortes d'expression et de sécrétion de trois adipokines (leptine, adiponectine et résistine) en réponse au découplage mitochondrial induit chimiquement en traitant les adipocytes 3T3-L1 avec du FCCP (A. De Pauw, thèse de doctorat, 2010).

Dès lors, **le premier objectif de ce mémoire** était d'étendre le profil d'expression de plusieurs adipokines dans les adipocytes 3T3-L1 exposés au découplage mitochondrial ou stimulés par le $\text{TNF}\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire dont la concentration est augmentée dans le tissu adipeux blanc d'individus obèses.

Dans l'introduction de ce travail, nous avons souligné le rôle prépondérant du facteur de transcription $\text{PPAR}\gamma$ dans le contrôle de l'expression de ces adipokines. Des données du laboratoire montrent également que l'expression de ce facteur, sa capacité de liaison à l'ADN et son activité de trans-activation sont diminuées dans les adipocytes exposés au FCCP (Tejerina et al., 2009). Cependant, aucune augmentation d'expression de ces adipokines n'a été observée dans des adipocytes co-incubés en présence de FCCP et de ligands exogènes de $\text{PPAR}\gamma$ (rosiglitazone et acide 9 cis-rétinoïque). Ajouté au fait que le découplage mitochondrial modifie le métabolisme cellulaire (diminution de la production d'ATP), qui, nous l'avons vu, peut affecter le contrôle épigénétique de l'expression génique, ces résultats suggèrent un possible niveau de régulation d'ordre épigénétique de l'expression de gènes codant pour certaines de ces adipokines. Un sujet d'étude débuté l'an dernier (A.-S. Gathy, mémoire, 2013) pour lequel peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature. **Le deuxième objectif de ce mémoire** était donc d'analyser les éventuels changements du niveau de méthylation au sein de fragments de promoteurs de gènes codant pour la leptine et l'angiotensinogène dans les adipocytes 3T3-L1 exposés au découplage mitochondrial.

3 Matériel et méthodes

3.1 Culture et différenciation des 3T3-L1

Les adipocytes cultivés et étudiés dans le cadre de ce mémoire sont les adipocytes 3T3-L1. Les cellules 3T3-L1 déjà engagées dans la différenciation adipocytaire, sont achetées au stade de pré-adipocytes/fibroblastes à l'ATCC (*American Type Culture Collection*, USA). Dans le cadre de ce mémoire, nous utiliserons cette lignée en tant que modèle de pré-adipocytes non différenciés. La différenciation en adipocytes est initiée par une incubation des cellules en présence d'un cocktail pro-adipogénique contenant de l'insuline, de l'AMPc et de la dexaméthasone, comme décrit dans le protocole ci-dessous.

3.1.1 Repiquage

Les pré-adipocytes sont cultivés à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ dans du milieu DHG-L1 (*Dubelco modified Eagle's medium high glucose* (4,5 g/l) additionné de 1,5 g/l de NaHCO₃) et supplémenté avec 10 % de sérum de bovin fœtal (milieu complet). Lorsque les cellules sont à 70-80 % de confluence, les pré-adipocytes doivent être repiqués. Le tapis cellulaire est rincé à 2 reprises avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) stérile préchauffé à 37 °C (Lonza, USA). Après 2 min d'incubation en présence de 2 ml de trypsine/EDTA (Gibco, USA), les cellules sont détachées et resuspendues dans un volume de 10 ml de milieu complet. Les cellules sont diluées 2 ou 4 fois puisensemencées dans de nouvelles boîtes de culture T75 (Corning, USA) contenant 15 ml de milieu complet. A chaque doublement de la population cellulaire, un passage est compté. La culture cellulaire est maintenue jusqu'à maximum 15 passages, moment à partir duquel le taux de différenciation diminue rapidement (Vankoningsloo, thèse de doctorat).

3.1.2 Différenciation des pré-adipocytes en adipocytes

Lorsque les pré-adipocytes ont atteint la confluence, les cellules sont incubées pendant 48 h en présence de milieu complet supplémenté de molécules pro-adipogéniques : dibutyryl cyclic-AMP (300 µM), dexaméthasone (1 µM) et insuline (5 µg/ml). Le milieu est ensuite remplacé par du milieu complet contenant de l'insuline (5 µg/ml). Toutes les 48 h, ce milieu est renouvelé. La différenciation est considérée comme terminée après 12 jours de culture, stade auquel les adipocytes doivent représenter 95 % de la population cellulaire.

3.1.3 Traitement avec le TNFα ou le FCCP

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 sont incubés pendant 1, 3 ou 6 jours avec du TNFα (10 ng/ml) ou du FCCP (0,5 µM). Les cellules contrôles sont des adipocytes incubés pendant la même période en l'absence de ces 2 molécules. Le milieu est remplacé tous les jours pour minimiser l'acidification du milieu.

3.2 Analyse de l'expression génique

3.2.1 Extraction et purification de l'ARNm

Après 12 jours de différenciation et 3 jours d'incubation en présence ou en absence de FCCP ou de TNFα, les adipocytes cultivés en boîte de culture à 6 puits (Corning, USA) sont

Réactifs	Volume (µl)/ puits
Tampon RT 5X	4
Reverse transcriptase (unités enzymatiques)	0,5
Inhibiteurs de RNAses	0,5
Mix de dNTPs (10 mM)	2

Tableau 1 : Volume des réactifs de la mixture réactionnelle pour la RT-PCR.

rincés deux fois avec 5 ml de PBS *RNase free* (Lonza, USA) à température ambiante (TA). Les cellules sont lysées en présence de 1 ml de QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Allemagne) et récoltées à l'aide d'un grattoir dans un microtube (Eppendorf, USA). Le mélange cellules - QIAzol Lysis Reagent est laissé au repos pendant 5 min. Afin de séparer l'ARN des lipides et des protéines, le lysat cellulaire est incubé pendant 5 min avec 200 µl de chloroforme *RNase free*. Après homogénéisation des 2 phases pendant 30 s, le mélange lysat cellulaire-chloroforme est laissé au repos pendant 3 min puis est centrifugé pendant 15 min à 12000 g à 4°C. Un volume de 600 µl de surnageant contenant l'ARN est transféré dans un nouveau microtube. La purification de l'ARN est poursuivie à l'aide du mini kit RNeasy (QIAGEN, Allemagne), procédure automatisée avec le QIAcube (QIAGEN) en suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, la première étape de purification des échantillons est réalisée par centrifugation (15 s, 8000 g) (Merck, Allemagne) des échantillons placés sur une colonne *RNeasy spin* (QIAGEN) en présence de 600 µl d'éthanol (Merck, Allemagne) 70 %. Au cours de cette étape, l'ARN va se lier à la matrice de silice de la colonne et les contaminants tels que les protéases seront éliminés. L'ARN purifié est ensuite rincé par centrifugation (15 s, 8000 g, TA) avec un volume de 700 µl de tampon RW1 (QIAGEN). Cette étape permet également de sélectionner les ARNs de taille supérieure à 200 nucléotides. Deux derniers rinçages avec un volume de 500 µl de tampon RPE (QIAGEN) suivis d'une centrifugation (15 s, 8000 g) permet d'éliminer les sels restants. L'ARN est finalement élué dans un volume final de 30 µl d'eau *RNase free* (QIAGEN). Les échantillons sont stockés à -80 °C en attente des manipulations ultérieures.

3.2.2 Dosage de la concentration en ARN

Afin de déterminer le volume d'ARN élué à prélever en vue de réaliser la rétrotranscription, la concentration en ARN de chaque échantillon est déterminée. Pour cela, un volume de 1 µl d'ARN purifié est déposé sur la zone de quantification du spectromètre UV, le Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La mesure de la concentration s'effectue à la longueur d'onde d'absorbance de l'ADN (260 nm). Une mesure est également effectuée par le Nano Drop à 280 nm et à 230 nm correspondant respectivement à la longueur d'onde d'absorption des protéines et celle des composés phénols/sels. Ceci permet le calcul des rapports A260/A280 et A260/A230 renseignant sur le degré de pureté des échantillons d'ARN. Le rapport A260/A280 doit être supérieur à 1,8 et le rapport A260/A230 doit être supérieur à 2 pour considérer l'échantillon d'ARN comme pur. La concentration en ARN est calculée selon la loi de Beert-Lambert.

3.2.3 Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

La reverse transcription d'ARN en ADNc est exécutée à l'aide du kit *Transcription First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche, Suisse) en utilisant des amorces « *anchored oligo (dT)₁₈* » (oligodT). Les échantillons d'ARN doivent être gardés à 4°C durant toute la manipulation. Un volume de 12 µl contenant 2 µg d'ARN (>200 nucléotides) purifié est préparé par dilution de l'échantillon d'ARN purifié avec de l'eau *RNase free*. Après l'ajout d'un volume de 1 µl d'oligodT à l'ARN dilué, l'échantillon est incubé pendant 10 min à 65 °C pour permettre l'hybridation des oligodTs. Après l'incubation, la mixture réactionnelle pour la RT-PCR est ajoutée aux échantillons (**Tableau 1**). Les échantillons sont ensuite

Nom	Amorce sens	Amorce anti-sens
Apéline	5'-CTGCTGCTCTGGCTCTCCTT-3'	
		5'-TCACCAGGTAGCGCATGCT-3'
Chémérine	5'-AACACCCACCTGTGCAGTTG-3'	
		5'-AGTTGGTCTGCTGGAGCTTAAA-3'
Thrombospondine-1	5'-ATCATCTGCGGAGAGGACACA-3'	
		5'-TTGTCCTTTTTCAGTGGTAGGT-3'
Sérum amyloïd A1	5'-GGAACATATGATGCTGCTCAAAGG-3'	
		5'-TCAGCAATGGTGTCTCATGTC-3'
Leptine	5'-GATCCACGTGCCACAGTCT-3'	
		5'-GGAACAAGCCATAGTGCAAGGT-3'
Adiponectine	5'-TGGCTTTCTTCTCTACCATGATACC-3'	
		5'-TAAGCTGAAAGTGTGTCGACTGTTC-3'
Résistine	5'-CCAGAAGGCACAGCAGTCTTG-3'	
		5'-GCACACTGGCAGTGACACACTT-3'
TATA-box binding protein	5'-CAGTTACAGGTGGCAGCATGA-3'	
		5'-TAGTGCTGCAGGGTGATTCAG-3'

Tableau 2 : Séquences des couples d'amorces (sens et anti-sens) utilisés pour la *real time* RT-qPCR.

Réactifs	Volume (µl)/puits
H ₂ O Milli-Q	2,5
Primer anti-sens 3 µM	2,5
Primer sens 3 µM	2,5
Mix SYBR Green (dNTP, polymérase, SYBR Green, tampon)	12,5

Tableau 3 : Volume des réactifs de la mixture réactionnelle pour la RT-qPCR.

Etapas		# de Cycle(s)	Température (°C)	Durée (min)
Préchauffage		1	50	2
Dénaturation initiale		1	95	10
Amplification	Dénaturation	40	95	0,25
	Elongation		60	1
Finale		1	95	0,25
		1	60	0,25
		1	95	0,25
Refroidissement		/	RT	∞

Tableau 4 : Paramètres de la PCR en temps réel.

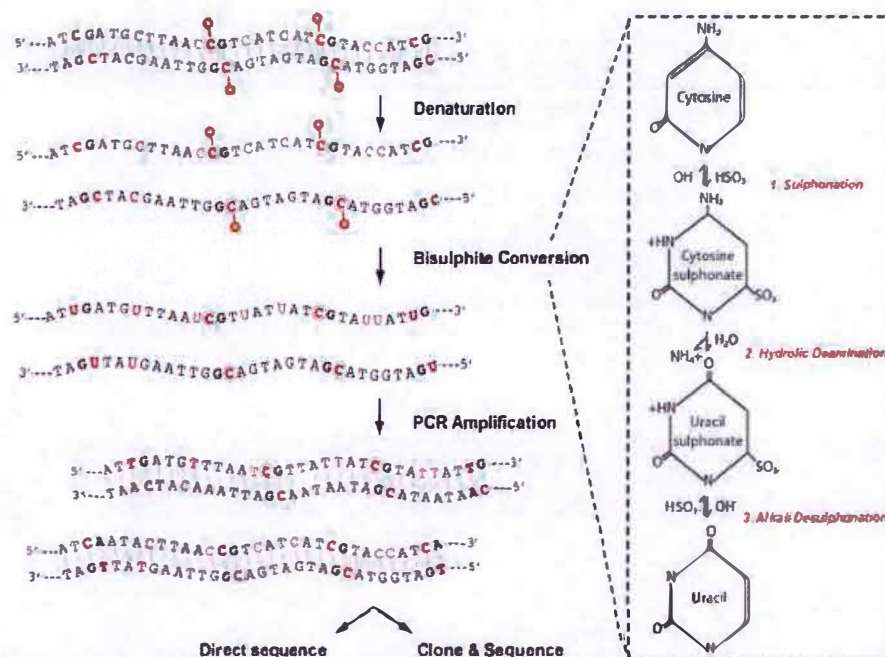


Figure 1 : Représentation des réactions chimiques de la conversion au bisulfite des cytosines non méthylées en uracile.

L'analyse de la méthylation de l'ADN passe par 4 étapes : la dénaturation, la conversion au bisulfite et l'amplification. Enfin, le produit PCR peut soit être purifié pour être directement séquencé, soit le produit PCR peut être sous-cloné dans un plasmide et amplifié par des bactéries compétentes *Escherichia Coli* TGI en vue d'être séquencé. La conversion au bisulfite est composée de 3 étapes : la sulfonation, la désamination hydrolytique et la désulphonation alcaline. Le principe de la conversion au bisulfite repose sur la protection de la désamination du groupement amine par la présence du groupement méthyle des 5-méthylecytosines, symbolisé par un cercle rouge, alors que la cytosine non méthylée (en position 5') est sulfonée à pH basique au niveau de la double liaison 5-6. La cytosine sulfonate obtenue est ensuite désaminée en uracile sulfonate par hydrolyse. Enfin, le groupement sulfonate est retiré en condition alcaline, une réaction nommée « désulphonation alcaline » (d'après Patterson et al., 2011).

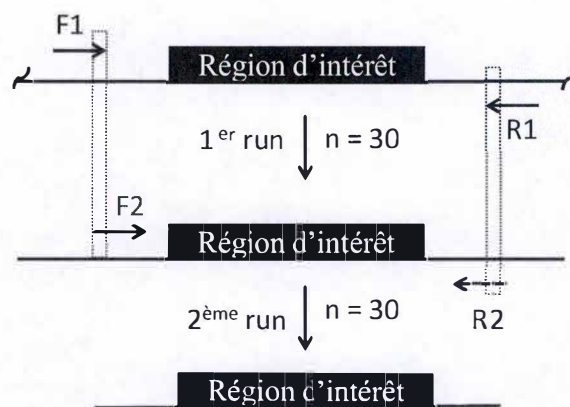


Figure 2 : Principe de la PCR nichée.

La région d'intérêt de l'ADN converti au bisulfite est d'abord amplifiée au moyen d'un couple d'amorces F1 (Sens 1) et R1 (Anti-Sens 1). Après la première amplification, le produit PCR du 1^{er} run est récupéré pour effectuer une seconde PCR à l'aide d'un autre couple d'amorces F2 (Sens 2) et R2 (Anti-Sens 2). Ces amorces possèdent une courte séquence en commun avec les amorces du premier couple (« overlap ») et sont positionnées de manière plus interne. Cette PCR a la particularité d'être plus sensible que la PCR classique grâce à ses 2 runs. n : nombre de cycles.

incubés pendant 30 min à 55 °C, température optimale d'activité de la rétro-transcriptase. L'enzyme est ensuite dénaturée en incubant les échantillons pendant 5 min à 85 °C. Les échantillons d'ADNc obtenus sont refroidis sur glace puis stockés à -20 °C.

3.2.4 PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel nécessite l'utilisation d'amorces (IDT, USA) (**Tableau 2**), du SYBR Green master mix et un thermocycleur (ABI 7900 HT, Applied Biosystem, USA) permettant la mesure de l'abondance du transcrit cible au cours des cycles d'amplification. Outre la présence de l'agent intercalant SYBR Green, la mixture réactionnelle contient également une FastStart *Taq* DNA polymérase, des dNTPs et le tampon adapté pour la polymérase (Roche, Suisse).

D'abord, un volume de 1 µl d'ADN est dilué dans 99 µl d'eau milli-Q *nuclease free*. Les amorces sens et anti-sens (**Tableau 2**) préparées à une concentration stock de 27 µM sont diluées avant usage afin d'obtenir une concentration finale de 3 µM. Ensuite, le « mix » RT-qPCR est préparé en mélangeant les différents réactifs (**Tableau 3**). Un volume de 5 µl d'ADNc dilué est ensuite ajouté au 20 µl de mixture réactionnelle dans chaque puits d'une plaque 96 puits (volume final : 25 µl). Un contrôle négatif est également réalisé en remplaçant l'ADNc par un volume de 5 µl d'eau milli-Q. Après avoir scellé la plaque avec une feuille plastique, la plaque est centrifugée pendant 1 min à 1000 rpm. Les paramètres de la PCR sont décrits au **Tableau 4**.

3.2.5 Analyse des résultats

Disposant d'une condition test (adipocytes 3T3-L1 traités avec le FCCP ou le TNFα) et d'une condition contrôle (adipocytes 3T3-L1 non-traités), les résultats peuvent être exprimés en abondance relative du transcrit ciblé. La méthode de calcul choisie pour déterminer l'abondance relative repose sur la formule : $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et Schmittgen, 2001). La normalisation est effectuée en mesurant l'abondance relative du transcrit du gène de ménage (« *house keeping gene* ») codant pour la sous-unité « *TATA-box binding protein* » (TBP) du facteur de transcription TFIID (*Transcription Factor II D*). La condition de référence utilisée pour comparer les changements d'expression correspond aux adipocytes 3T3-L1 cultivés en présence de milieu complet pendant un temps comparable à celui du temps de traitement étudié.

3.3 Analyse du taux de méthylation de fragments d'ADN par traitement au bisulfite

3.3.1 Principe

Les étapes du protocole en vue d'analyser le degré de méthylation d'ADN par séquençage au bisulfite des fragments du promoteur de la leptine et de l'angiotensinogène sont schématisées sur la **Figure 1** (Patterson et al., 2011). Cette technique a permis l'identification et la quantification de l'ADN méthylé à la résolution d'une base. Le bisulfite permet de convertir les cytosines non méthylées en uracile alors que les cytosines méthylées ne sont pas affectées. Une fois l'ADN converti, la région d'intérêt peut être amplifiée par PCR nichée (**Figure 2**). Le produit de la PCR nichée est alors cloné dans le vecteur pGEM T-Easy

linéarisé (Promega, USA). Le produit de la ligation sera utilisé pour transformer des bactéries compétentes par électroporation. Le système « blanc/bleu » permettra de sélectionner les clones destinés au séquençage. Ce système repose sur l'utilisation de bactéries possédant une forme tronquée du gène LacZ codant pour la β -galactosidase. Cette dernière est constituée de 2 sous-unités : alpha et omega. Les bactéries utilisées dans ce travail ne disposent pas du fragment codant pour la sous-unité alpha. Cependant, le plasmide utilisé dans ce travail code pour le fragment manquant de la β -galactosidase et permet ainsi l'expression de cette enzyme si la bactérie est transformée au moyen de ce plasmide. En présence d'IPTG (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) et de X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*), la β -galactosidase hydrolyse le X-Gal et une coloration bleue est obtenue. En cas d'insertion du produit PCR d'intérêt, le fragment manquant de la β -galactosidase ne peut être exprimé et le clone bactérien reste de couleur blanche.

3.3.2 Matériel et méthodes

3.3.2.1 Identification d'îlots CpG

Les séquences de promoteur des gènes codant pour les adipokines étudiées chez la souris *Mus musculus* ont été trouvées à l'aide de la base de données *Ensembl* et analysées pour la présence d'îlots CpG à l'aide du logiciel *Methprimer* (Long-Chen et al., 2002). Les paramètres utilisés pour détecter la présence d'îlots CpG dans le promoteur de la leptine et de l'angiotensinogène sont ceux proposés par défaut, obéissant à la définition de l'îlot CpG (Takai et Jones, 2004) (CpG observé/CpG attendu : $> 0,6$; % CG : 50 %).

3.3.2.2 Extraction de l'ADNg

L'extraction et la purification de l'ADNg comportent 4 étapes :

- la lyse cellulaire ;
- la dégradation des protéines et de l'ARN ;
- la précipitation de l'ADNg ;
- la solubilisation de l'ADNg.

Après 12 jours de différenciation et 3 jours d'incubation en présence ou en absence de 10 ng/ml de TNF α ou de 0,5 μ M de FCCP, l'ADNg des adipocytes 3T3-L1 cultivés en boîte T25 (Corning, USA) est extrait en utilisant le kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega, USA). Pour cela, les cellules sont d'abord rincées 2 fois avec 7 ml de PBS et récoltées dans un volume de 500 μ l de PBS *nuclease free* à l'aide d'un grattoir pour être transférées dans un microtube. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 13000 g. Les cellules sont alors resuspendues et lysées dans un volume de 600 μ l de solution de lyse nucléaire (Promega, USA) pendant 15 min à 37 °C. Un volume de 3 μ l de RNase est ajouté au mélange. Les protéines sont ensuite précipitées en mélangeant un volume de 200 μ l de *solution de précipitation des protéines* (Promega, USA) au lysat cellulaire. Au terme d'une incubation de 5 min à 4°C, les protéines sont isolées par centrifugation pendant 4 min à 13000 g et le surnageant est transféré dans un nouveau microtube contenant 600 μ l d'isopropanol (Merck, Allemagne) permettant de précipiter l'ADNg. Une centrifugation de 1 min à 13000 g permet alors de culoter l'ADN qui est rincé par un volume de 600 μ l d'éthanol (70 %) (Merck, Allemagne). Après une dernière centrifugation de 1 min à 13000 g, le culot d'ADN

Promoteur du gène	Régions d'intérêt	PCR run	Amorce	Séquences des amorces	Température d'hybridation (°C)
<i>Lep</i>	Site à proximité du site de liaison de C/EBP α	1 ^{er}	Sens	5'- GAAAAAGTAGTTGGTAGAGTTT -3'	48,3
			Anti-sens	5'- CCTCCTTCTTACCTCAATTTC -3'	50,5
		2 ^{ème}	Sens	5'- GGTAGAGTTTGGTTTATTGGT -3'	50,7
			Anti-sens	5'- CCTCAATTTCTCTAATTTCCAAAAC -3'	50,8
	Site près du site de liaison de PPAR γ	1 ^{er}	Sens	5'- ATTGGTYGTGGAGATTTTYG -3'	50,9
			Anti-sens	5'- CTCAACAACACRTCCATTCAA -3'	52,3
		2 ^{ème}	Sens	5'- TTAAGTTGGATTGATTTGGAAT -3'	50,7
			Anti-sens	5'- ACCCATAACRTCTCTAACTAAACTT -3'	53,1
<i>Agt</i>	Site en aval du site de liaison de PPAR γ	1 ^{er}	Sens	5'- GGGAGTAGGTTAGGGTTGTTTTG -3'	55,4
			Anti-sens	5'- GTTCTCACRACRGACCAAAA -3'	53
		2 ^{ème}	Sens	5'- GTAGGTTAGGGTTGTTTTGGGT -3'	54,9
			Anti-sens	5'- ACCACAAACCAAAATCTTCTACR -3'	53,1

Tableau 5 : Séquences des couples d'amorces (sens et anti-sens) utilisés pour la PCR nichée.

Réactifs	Concentration finale	Volume (µl)
Amorce sens (10 µM)	0,2 µM	0,5
Amorce anti-sens (10 µM)	0,2 µM	0,5
<i>Taq BioLab</i> 2X Master Mix	1 X	12,5
H ₂ O <i>nuclease free</i>	/	9,5
ADN template	< 1,000 ng	2

Tableau 6 : Volume et concentration finale des réactifs de la PCR nichée.

Etapas		# de Cycle(s)	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale		1	95	30 s
Amplification	Dénaturation	30	95	15-30 s
	Hybridation		45-68	15-60 s
	Elongation		68	1 min/kb
Extension finale		1	68	5 min
Refroidissement		/	4-10	∞

Tableau 7 : Paramètres de la PCR nichée.

est séché pendant 15 min à 65 °C. L'ADNg est ensuite resuspendu dans un volume de 100 µl d'une solution de réhydratation de l'ADN (Promega, USA) et incubé à 65 °C pendant 1 h ou pendant 16 h à 4 °C. L'ADN est finalement stocké à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

3.3.2.3 Conversion des cytosines non méthylées au bisulfite

La conversion des cytosines non méthylées en uracile a été effectuée à l'aide du kit *EZ DNA methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research Corporation, USA). Une conversion au bisulfite efficace requiert une quantité d'ADN de départ comprise entre 200 et 500 ng contenue dans un volume de 20 µl. Un volume de 130 µl de d'agent de conversion CT (Zymo Research Corporation, USA) est ajouté à l'ADN dilué. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur (Eppendorf, USA) programmé pour induire une dénaturation de l'ADN pendant 10 min à 98 °C puis une conversion au bisulfite pendant 2,5 h à 64 °C. Les échantillons sont ensuite transférés sur une colonne *Zymo-Spin IC* comportant une matrice de silice pré-conditionnée avec 600 µl de tampon de liaison M (Zymo Research, USA). L'ADN est alors isolé par affinité avec la matrice par une étape de centrifugation pendant 30 s à 10000 g. L'ADN retenu sur la colonne est rincé en ajoutant un volume de 100 µl de tampon de rinçage M (Zymo Research, USA) suivi d'une étape de centrifugation pendant 30 s à 10000 g. Pour finaliser la réaction de conversion au bisulfite, l'ADN est incubé en présence d'un volume de 200 µl de tampon de désulphonation M (Zymo Research, USA) pendant 20 min. Ce tampon est alors éliminé par une centrifugation de 30 s à 10000 g et l'ADN est alors rincé deux fois par un volume de 200 µl de tampon de rinçage M. L'ADN converti au bisulfite est finalement élué dans un microtube de 1,5 ml avec un volume de 10 µl de tampon d'éluion M (Zymo Research, USA). L'ADN converti est stocké à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

3.3.2.4 PCR nichée

Suite à la faible quantité d'ADN récoltée après l'étape de conversion au bisulfite, nous avons opté pour une PCR nichée qui consiste à succéder 2 PCR l'une à la suite de l'autre (**Figure 2**). Les amorces sens et anti-sens (IDT, USA) (**Tableau 5**) sont conçues avec l'algorithme Primer-BLAST (Ye et al., 2012) et vérifiées en utilisant l'algorithme Primer3 (Untergasser et al., 2012). Les amorces sont d'abord diluées avec de l'eau *nuclease free* de manière à obtenir une concentration finale de 10 mM. La composition de la mixture réactionnelle pour la PCR nichée est donnée au **Tableau 6** et obtenue en mélangeant les amorces sens et anti-sens diluées avec le Master Mix *Taq* BioLab contenant l'enzyme *Taq* polymérase. Un volume de 2 µl d'ADNg converti au bisulfite est ajouté à 23 µl de mix PCR nichée pour obtenir un volume final de 25 µl dans des microtubes PCR. Ces derniers sont placés dans un thermocycleur (Eppendorf, USA) dont les différents paramètres sont présentés au **Tableau 7**. Dans le contrôle négatif du premier run de la PCR nichée, l'ADN est remplacé par 2 µl d'eau milli-Q. Une fois le premier run terminé, un volume de 2 µl du produit PCR est récolté et ajouté à 23 µl de mix du 2^{ème} run de la PCR nichée (**Tableau 6**). Ce mix diffère de celui du premier run de la PCR nichée par son couple d'amorces. Un volume de 2 µl du contrôle négatif du premier run de la PCR nichée est récupéré pour constituer le contrôle négatif du deuxième run de la PCR nichée. Les produits de la PCR sont finalement stockés à -20 °C.

Réactifs	Echantillon (μ l/puits)	CTL + (μ l /puits)	CTL – (μ l/puits)
2 X Rapid Ligation Buffer	5	5	5
pGEM®-T ou pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1	1	1
Produit de la PCR nichée	2	/	/
Control insert DNA	/	2	/
T4 DNA ligase (3 Weiss units/ μ l)	1	1	1
H ₂ O <i>nuclease</i> free	1	1	3

Tableau 8 : Volume des réactifs de la ligation.

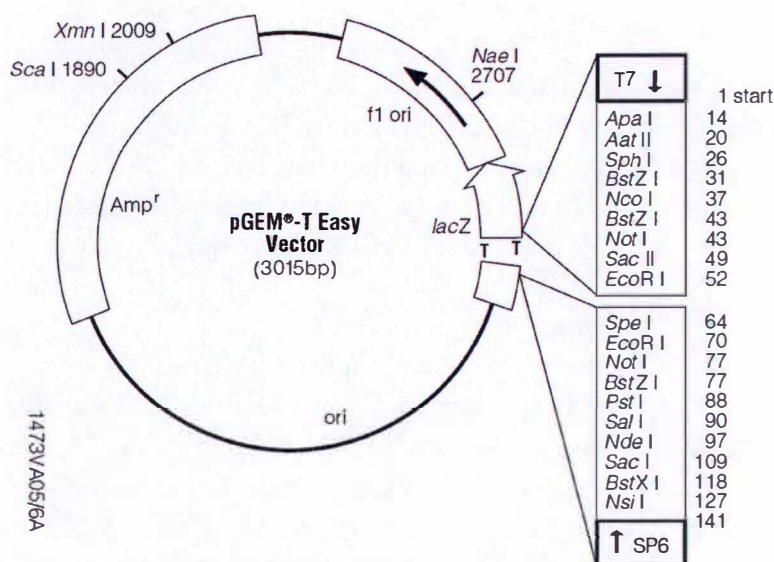


Figure 3 : Carte du vecteur de pGEM-T Easy (Promega, USA).

Le plasmide pGEM-T Easy est linéarisé et contient à ses extrémités 3' une thymidine compatible avec l'adénosine ajoutée aux extrémités 3' du produit PCR de la PCR nichée par la *Taq*BioLab polymérase. Le vecteur pGEM-T Easy comprend un gène *LacZ* codant pour la β -galactosidase. Ce gène est inactivé par insertion du produit PCR de la PCR nichée ce qui permet d'identifier les transformants recombinés par un test « blanc/bleu » sur un milieu comportant le substrat de l'enzyme.

3.3.2.5 Electrophorèse sur gel d'agarose 2% et purification des fragments d'ADN d'intérêt

Afin de vérifier, de manière qualitative, la présence du fragment d'ADN amplifié, le produit PCR est séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose (Invitrogen, USA) 2 % préparé dans du tampon TBE 1X (pH 8,3) (Eppendorf, USA). Le mélange est porté à ébullition puis un volume de 15 µl de bromure d'éthidium (un agent intercalant l'ADN) est ajouté après refroidissement. Le gel d'agarose 2 % est alors coulé, laissé à polymériser et disposé dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X. Les produits PCR de la PCR nichée (volume total : 25 µl) sont mélangés à un volume de 5 µl de tampon de charge bleu/orange (Promega, USA) et déposés dans les puits du gel.

Des marqueurs de poids moléculaire (1 kb, Promega, USA) sont utilisés pour estimer la taille des fragments. Une fois la migration terminée (100 V pendant 1 h), le gel est analysé sous rayonnement UV et la bande du gel contenant le fragment d'intérêt à la taille attendue est excisée, placée dans un microtube et pesée. Le produit PCR est extrait du gel d'agarose et purifié en utilisant le *Wizard SV Gel and PCR clean-up system kit* (Promega, USA). Le gel d'agarose est dissout dans environ 150 µl de solution de liaison (10 µl par 10 µg de gel d'agarose) et incubé à 65 °C pendant 10 min, en vortexant toutes les 2 min. Le mélange est ensuite transféré sur une colonne *SV Minicolumn* (Promega, USA). Les échantillons sont alors incubés pendant 1 min à TA permettant à l'ADN de se lier à la matrice de silice de la colonne. Après une étape de centrifugation (1 min à 16000 g), deux rinçages successifs sont effectués avec, respectivement, un volume de 700 et 500 µl de solution de rinçage (Promega, USA). L'ADN est récupéré dans un volume de 50 µl d'eau *nuclease free* pendant 1 min puis centrifugé pendant 1 min à 16000 g à TA.

3.3.2.6 Sous-clonage dans le vecteur plasmidique pGEM®-T Easy

La ligation est effectuée en mélangeant le produit de la PCR nichée purifié avec un mix de réaction de ligation (**Tableau 8**) contenant notamment le vecteur pGEM®-T Easy linéarisé (**Figure 3**). Les échantillons sont ensuite incubés pendant 16 h à 4 °C ou 1 h à TA afin d'obtenir un maximum de clones transformés. Le produit de ligation est stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation.

3.3.2.7 Transformation d' *E. Coli* DH10B par électroporation

Afin d'augmenter le nombre de copies du vecteur recombiné, des bactéries compétentes *E. Coli* DH10B sont transformées par électroporation avec le produit de ligation. Pour ce faire, un volume de 1 µl du produit de ligation est ajouté à 50 µl de bactéries compétentes conservées sur glace pendant maximum 1 h. Les bactéries sont ensuite électroporées à 2500 V dans une cuvette d'électroporation (btx harvard apparatus ecm 399 electroporation system, Harvard Bioscience company, USA). Une fois électroporées, les bactéries sont resuspendues dans 150 µl de milieu LB (*Luria Bertani*) (Miller, USA) liquide et transférées dans un microtube. Les bactéries sont ensuite étalées de façon homogène sur un milieu autoclavé de LB (20 g/l)/agar (Miller, USA) (1,5 g/100 ml) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), du X-Gal (5-bromo-4-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (50 mg/ml) (Promega, USA) et de l' IPTG (*Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside*) (0,1 M) (Sigma, USA) dans le

Réactifs	Concentration finale (μl)	Volume/puits (μl)
Tampon GoTaq 5X	1,5 mM	10
Mix de dNTP (10 mM)	0,2 mM/dNTP	1
Primer pUC/M13 F (25 μM)	0,2 μM	1
Primer pUC/M13 R (25 μM)	0,2 μM	1
GoTaq® G2 DNA polymérase (5U/μl)	1,25 U	0,25
ADN template	< 0,5 μg/50 μl	/
H ₂ O <i>nuclease free</i>	/	36,75

Tableau 9 : Réactifs du mix de la PCR sur colonies.

Amorce	Séquences	Température d'hybridation (°C)
pUC/M13 sens	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3'	50,6
pUC/M13 anti-sens	5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'	47

Tableau 10 : Séquences du couple d'amorces (sens et anti-sens) pour la PCR sur colonies.

Etapes		# de cycle(s)	Température (T°C)	Temps (sec)
Dénaturation		1	94	30
Amplification	Dénaturation	25	94	30
	Hybridation		50,8	60
	Elongation		72	30
Elongation finale		1	72	5

Tableau 11 : Paramètres de la PCR sur colonies.

but de réaliser le test « blanc/bleu » permettant de sélectionner des clones possédant le plasmide recombiné (colonies blanches apparues après une incubation de 16 h à 37 °C).

3.3.2.8 PCR sur colonies

Afin de vérifier si la colonie blanche possède le vecteur pGEM-T® Easy recombinant, les colonies blanches sont prélevées stérilement et inoculées dans un milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (Amp) à la concentration de 100 µg/ml. Les tubes de culture sont incubés pendant 16 h à 37°C avec une agitation de 250 rpm. En parallèle, ces colonies sont également utilisées pour effectuer une « PCR sur colonies » dans un volume de 50 µl de mélange réactionnel (**Tableau 9**) contenant un couple d'amorces pUC/M13 (IDT, USA) (**Tableau 10**) à l'aide d'un thermocycleur dont les paramètres d'utilisation sont détaillés au **Tableau 11**. Après amplification, le produit PCR est mélangé à un volume de 10 µl de tampon de charge bleu/orange (Promega, USA). Un volume de 25 µl est prélevé et disposé dans un puits du gel d'agarose 2 % et l'électrophorèse est réalisée comme indiqué au **point 3.3.2.5**. Les colonies révélées positives par « PCR sur colonies » sont sélectionnées pour la suite du travail qui consiste à extraire l'ADNp (ADN plasmidique).

3.3.2.9 Miniprep d'ADNp

L'extraction d'ADNp est réalisée à l'aide du kit *QIAprep® Spin Miniprep* (QIAGEN, Allemagne). D'abord, les bactéries sont isolées par centrifugation pendant 3 min à 6800 g à TA. Le culot de bactéries est ensuite resuspendu dans un volume de 250 µl de tampon P1 puis transféré dans un nouveau microtube (QIAGEN, Allemagne). L'ajout d'un volume de 250 µl de tampon P2 permet une lyse alcaline des bactéries suivie d'un mélange par inversion. La neutralisation est réalisée en ajoutant au mélange un volume de 350 µl de tampon N3. Après une centrifugation de 10 min à 17900 g, le surnageant est récupéré et transféré sur une colonne *QIAprep spin column* qui est alors centrifugée pendant 1 min à 1000 g. La colonne est ensuite rincée avec un volume de 750 µl de tampon PE et à nouveau centrifugée 1 min à 1000 g. La colonne est ensuite placée sur un nouveau microtube afin d'éluer l'ADNp dans un volume de 50 µl de tampon EB en centrifugeant pendant 1 min à 16000 g. L'ADNp extrait et purifié est finalement dosé au Nanodrop. Selon la concentration obtenue, les échantillons sont dilués avec de l'eau *nuclease free* de manière à obtenir une concentration de 100 ng/µl dans un volume final de 25 µl. Les échantillons dilués sont finalement envoyés à la firme Beckman Coulter Genomics (UK) pour être séquencés.

3.4 Silencage de l'expression des DNMTs par siRNA

3.4.1 Principe

Nous avons utilisé l'électroporation en vue d'introduire des siRNA (*short interfering RNA*) (Movahed et Li, 2012). Une fois dans la cellule, les siRNA sont pris en charge par le complexe RISC, lequel dirige la dégradation de l'ARN messager cible menant à une diminution de l'abondance du transcrit du gène d'intérêt. Le silencage médié par le siRNA est détaillé à la **Figure 4**.

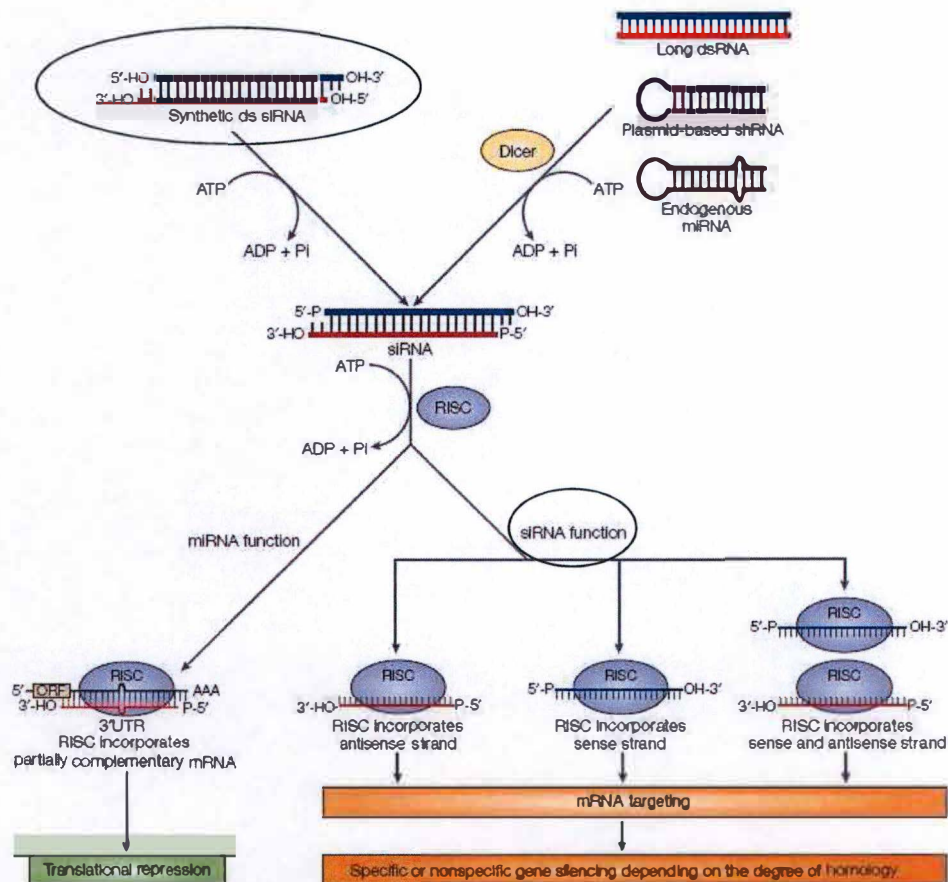


Figure 4 : Mécanisme de l'interférence par siRNA chez les mammifères (adapté de Mittal, 2004).

Le silençage par RNAi peut être médié par différents types de molécules incluant les longs dsRNAs, les shRNAs dérivés de plasmides ou les miRNAs endogènes en « épingle à cheveux ». Ces derniers sont clivés en duplex de 21 à 23 nucléotides par l'activité de DICER, une enzyme conservée au cours de l'évolution. Le duplex est ensuite phosphorylé au niveau des extrémités 5'. Dans le cas de siRNAs double brin synthétiques introduits dans la cellule en vue d'éteindre l'expression d'un gène, celui-ci n'est pas clivé par DICER mais est tout de même phosphorylé aux extrémités 5' par une kinase (non représentée sur le schéma) consommant de l'ATP. Ensuite, le siRNA formé est pris en charge par le complexe protéique nommé RISC. Ce dernier contient une hélicase qui déshybride le duplex siRNA d'une manière dépendante de l'ATP. Muni du brin guide anti-sens (en rouge), RISC cible l'ARN messager d'intérêt et le dégrade grâce à son activité endoribonucléase (par la protéine Argonaute 2) à un unique site au niveau de l'ARNm. A noter que cette dégradation n'a lieu qu'à condition que l'hybridation avec le transcrit cible soit parfaite. Les miRNAs s'hybrident à une séquence 3'-UTR avec une complémentarité imparfaite au transcrit cible conduisant à la répression de la traduction du messager. La méthode de silençage utilisée dans le cadre du mémoire est basée sur les siRNAs.

RNAi : *RNA interference*; ORF : *Open Reading Frame* ; RISC : *RNA-induced silencing complexe*; siRNA : *small interfering RNA*; UTR : *Untranslated Region*; dsRNA : *long double strand RNA*; shRNA : *Short hairpin RNA*; miRNA : *microRNA*. DICER : *Dicer I Ribonuclease type III*.

3.4.2 Coating des plaques 6 puits

Un volume de 2 ml de gélatine (0,25 %) diluée dans du PBS est transféré dans les puits d'une boîte de culture à 6 puits (10 cm²). Après 30 min d'incubation, la gélatine est enlevée et les puits sont séchés pendant 30 min dans une hotte à flux laminaire. Un volume de 2,5 ml de milieu complet contenant de l'insuline (5 µg/ml) est ajouté à chaque puits.

3.4.3 Resuspension des cellules

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 cultivés en boîte de culture (Corning Costar, USA) (75 cm²) sont rincés à 2 reprises avec 10 ml de PBS stérile puis trypsinisés à l'aide de 5 ml de trypsine/EDTA (Gibco, USA) pendant 15 min à 37 °C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 5 ml de milieu complet contenant 4 % de glycérol. Les cellules sont ensuite sédimentées par une centrifugation de 10 min à 1000 rpm. Après élimination du surnageant, les cellules sont resuspendues dans un volume de 35 ml de milieu complet contenant 4% de glycérol. Un volume d'environ 50 µl de la solution est prélevé pour réaliser un comptage cellulaire à l'aide d'une chambre de Neubauer. La densité cellulaire est ensuite ajustée à 2.10⁶ de cellules/ml.

3.4.4 Electroporation et silençage

L'électroporation est effectuée à l'aide du kit *Amaza L V-1005* (Lonza, USA). Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume de 100 µl d'une solution *Nucleofactor* adaptée à l'électroporation d'adipocytes 3T3-L1. Un volume de 3,1 µl de siRNA (concentration finale : 20 nM) est ajouté à chacune des suspensions cellulaires. Dans le contrôle négatif, un volume de 3,1 µl de siNTP (*Non Targeting Pool*) est ajouté aux cellules resuspendues. Les cellules sont ensuite transférées dans une cuvette d'électroporation Amaza. Après électroporation, les cellules sont diluées dans un volume de 500 µl de milieu complet contenant de l'insuline (5 µg/ml). Les cellules sont ensuite ensemencées dans les boîtes de culture à 6 puits coatées à la gélatine et placées à 37 °C dans un incubateur contenant une atmosphère humide et 5 % CO₂.

3.4.5 Traitement post-électroporation

Après 24 h d'incubation, le milieu de culture de chaque puits est remplacé par 5 ml de milieu complet en présence ou en absence de FCCP (0,5 µM). Après 3 jours de traitement, les cellules électroporées sont utilisées pour des extractions d'ARN ou de protéines nucléaires.

3.5 Analyse de l'abondance protéique par Western blotting

3.5.1 Préparation des extraits nucléaires

Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans des boîtes T75 (Corning, USA) puis différenciées en adipocytes selon le protocole décrit au **point 3.1.2**. A la fin de la différenciation, les cellules sont incubées pendant 72 h en présence ou en absence de FCCP (0,5 µM). Cette extraction peut également s'appliquer aux adipocytes transfectés avec les siRNA.

Au terme des incubations, les cellules sont rincées avec 15 ml de PBS. Les cellules sont ensuite rincées à 2 reprises avec 10 ml de tampon hypotonique (*Hypotonic buffer*, HB

BSA	0 µg	1 µg	2,5 µg	5 µg	7,5 µg	10 µg
Vol de BSA	0 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl
Vol d'eau	10 µl	9 µl	7,5 µl	5 µl	2,5 µl	0 µl
Vol de réactif	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Tableau 12 : Volume des réactifs pour les étalons du dosage de protéines selon la méthode de Pierce.

Tampon d'électrophorèse MOPS (800 ml)	
Eau milli-Q	760 ml
Tampon d'électrophorèse 20 X	40 ml

Tableau 13 : Préparation du tampon d'électrophorèse MOPS.

1X). La membrane plasmique des cellules est ensuite fragilisée par une incubation de 20 min à 4°C en présence de 1 ml de tampon HB. Le gonflement des cellules est observé au microscope. Le tampon est décanté et les cellules sont incubées pendant 5 min en présence de 500 µl de tampon de lyse NP-40 (0,5 %) (500 µl de NP-40 100 % dilué dans 19,5 ml de HB 1X). Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans un microtube sur glace. Le culot de noyaux est ensuite récupéré par une centrifugation (1 min à 13000 rpm à 4°C) et resuspendu dans un volume de tampon RE (*Resuspension Buffer*) (4 ml de glycérol 87 % dans 16 ml de HB 1X) équivalent au volume occupé par le culot (environ 50 µl). La suspension nucléaire est répartie dans 2 microtubes. Pour déterminer l'abondance protéique, un volume de 100 µl de tampon DLA (*DIGE labelling buffer*) est additionné de 4 µl de PIC (*Protease Inhibitor Cocktail*) et 4 µl de PIB (*Phosphatase Inhibitor Buffer*). Pour le dosage de l'activité DNMTs, un volume de 100 µl de tampon SA (4 ml de glycérol 87 % et 4 ml de NaCl dans 12 ml de HB 1X) est utilisé. Des aliquots de ces échantillons sont stockés à -70 °C.

3.5.2 Dosage des protéines nucléaires par la méthode du réactif de Pierce 660 nm

Pour le dosage protéique BCA (Pierce, Thermo Scientific, USA), une courbe de concentration pour un standard protéique d'albumine bovine sérique (ASB) (1µg/µl) est d'abord préparée. Les standards sont ensuite dilués selon le **Tableau 12** pour couvrir un rang de concentrations allant de 0 à 10 µg/ml. Pour les échantillons, un volume de 2 µl d'échantillon d'extrait nucléaire est dilué dans 8 µl d'eau milli-Q et transféré dans les puits d'une plaque à 96 puits (Greiner Bio-1, Germany). Le tampon de resuspension de l'échantillon (RE ou DLA) est utilisé pour le blanc. Ensuite, un volume de 150 µl de réactif de la solution de Pierce (660 nm) est ajouté aux échantillons ou aux standards dilués. Au terme de 5 min d'incubation, l'absorbance du produit de réaction est mesurée dans un spectrophotomètre (Bio-rad, USA) à une longueur d'onde de 660 nm. La concentration protéique est calculée à partir de la droite d'étalonnage.

3.5.3 Préparation des échantillons

L'analyse de l'abondance des DNMTs en Western blot est réalisée sur un équivalent de 15 µg de protéines pour un volume final de charge de 15 µl contenant un quart de volume de bleu de charge *NuPage LDS Sample Buffer* et un vingtième de volume de DTT (*dithiothréitol*) 1 M. Le *Sample Buffer* contient du glycérol, lequel permet d'alourdir l'échantillon et de faciliter la charge de ce dernier dans les puits du gel d'électrophorèse. La rupture des ponts disulfures des protéines est assurée par le DTT. Chaque échantillon étant porté au volume de 15 µl avec de l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 10 min à 70 °C pour dénaturer les protéines puis centrifugés brièvement avant d'être chargés dans les puits du gel dont le pourcentage d'acrylamide est choisi en fonction de la taille de la protéine à analyser.

3.5.4 Préparation du gel NuPage et chargement des échantillons

Les puits du gel sont rincés avec de l'eau distillée puis avec du tampon d'électrophorèse MOPS 1X (Invitrogen, USA) requis pour la séparation de protéines de taille supérieure à 50 kDa. Le gel est placé et fixé dans une cuve d'électrophorèse. La cuve extérieure est remplie à moitié avec le tampon d'électrophorèse MOPS 1X (**Tableau 13**) et la

Tampon d'électrophorèse + antioxydant (200 ml)	
Tampon 1X	200 ml
Antioxydant NuPage	500 µl

Tableau 14 : Préparation du tampon d'électrophorèse et de l'antioxydant.

Tampon de transfert (200 ml)	
Tampon de transfert NuPage	10 ml
Méthanol	40 ml
Antioxydants NuPage	200 µl

Tableau 15 : Préparation du tampon de transfert NuPage.

PBS	
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM ; pH 7,4
KH ₂ PO ₄ (Merck, Allemagne)	100 mM
K ₂ HPO ₄ (Merck, Allemagne)	100 mM

Tableau 16 : Composition du *Phosphate Saline Buffer* (PBS).

cuve intérieure est remplie totalement avec du tampon d'électrophorèse 1X contenant de l'antioxydant (Invitrogen, USA) (**Tableau 14**). Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits du gel. Un volume de 7 µl d'un étalon de poids moléculaire *See Blue Plus 2 Standard* (Invitrogen, USA) est également chargé dans un des puits afin de pouvoir estimer le poids moléculaire des bandes correspondantes à la protéine d'intérêt.

3.5.5 Transfert semi-sec des protéines sur une membrane PVDF

Des papiers Wattman (Marcherey-Nagel, Allemagne) d'une surface comparable à celle du gel (8 x 9 cm²) et une membrane PVDF (Milipore, USA) (8 x 9 cm²) hydrophobe sont préparés. Les papiers Wattman sont imbibés de tampon de transfert NuPage (**Tableau 15**) alors que la membrane est hydratée pendant 1 min dans du méthanol puis équilibrée dans du tampon de transfert pendant au moins 5 min. Lorsque la migration des échantillons est terminée, le gel est démoulé et le gel concentrateur ainsi que le bleu de charge résiduel sont éliminés. Dans un appareil de transfert, un montage en « sandwich » est réalisé (gel et membrane PVDF hydratée insérés entre 2 papiers Wattman et une éponge imbibée de tampon de transfert). Le transfert est assuré par le passage d'un courant électrique de 72 mA (1mA/cm²) pendant 2 h.

3.5.6 Blocage de la membrane

Une fois le transfert terminé, le montage est démoulé et la membrane est récupérée et bloquée avec une solution bloquante *Odyssey Infrared Imaging System Blocking Buffer* (Licor Biosciences, USA) diluée 2 fois dans du PBS (**Tableau 16**) pendant 1 h à TA ou 16 h à 4 °C. Cette étape permet de limiter la liaison aspécifique des anticorps et par conséquent de limiter le bruit de fond lors du scan de la membrane.

3.5.7 Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires

La solution d'anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt est diluée de manière appropriée dans la solution bloquante Licor non diluée et contenant 0,1 % de Tween 20 (Bio-Rad, USA). La membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire (anti DNMT3a, 1000X, Abcam, USA) pendant 1 h à TA ou pendant 16 h à 4 °C. La membrane est ensuite rincée à 4 reprises pendant 5 min avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20. Ensuite, la membrane est incubée pendant 1 h à TA en présence de l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome (anti IgG lapin IR DYE 680 RT, 10000 X, Licor Biosciences, USA) dans la solution bloquante Licor contenant 0,1 % de Tween 20. Après l'incubation, la membrane est rincée à 4 reprises avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20. La membrane est placée sur un papier Wattman entre deux films plastiques et finalement séchée pendant 30 min à 37 °C à l'abri de la lumière.

3.5.8 Révélation et quantification

La membrane est alors placée dans un scanner (Odyssey Licor), le scan de la membrane est réalisé à l'aide du programme Odyssey, lequel est capable de mesurer l'intensité de la fluorescence émise par le fluorochrome greffé aux anticorps secondaires afin de visualiser les bandes correspondant à la protéine d'intérêt.

3.6 Dosage des activités enzymatiques DNMTs

3.6.1 Principe

Le dosage de l'activité des DNMTs à partir d'extraits nucléaires d'adipocytes 3T3-L1 a été réalisé à l'aide du kit *DNMT Activity/Inhibition assay* (Active Motif, USA).

Le principe du dosage des DNMTs repose sur un test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) et se base sur la capacité des protéines de type MBD (*Methylcytosine Binding Domain*) telles que les protéines MECP2 ou MBD2 (Jones et al., 1998), à reconnaître l'ADN méthylé et à s'y fixer. Les DNMTs présentes dans l'extrait nucléaire catalysent alors le transfert d'un groupement méthyle du substrat SAM sur le dinucléotide CpG des fragments d'ADN immobilisés au fond des puits d'une plaque 96 puits. La protéine MBD2b recombinante fusionnée à un tag « polyhistidines » se liera alors au motif méthylé et son abondance sera mesurée par une réaction colorimétrique en utilisant un anticorps reconnaissant le tag « polyhistidines » conjugué à une enzyme HRP (*horseradish peroxidase*). La concentration du produit formé par la réaction enzymatique sera mesurée par l'absorbance de la solution à 450 nm et directement proportionnelle au degré de méthylation de l'ADN et donc à l'activité de méthylation par les DNMTs.

3.6.2 Préparation des échantillons

Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans des boîtes T75 (Corning, USA) puis différenciées en adipocytes suivant le protocole décrit au **point 3.1.2**. A la fin de la différenciation, les cellules sont incubées pendant 72 h en présence ou en absence de FCCP (0,5 μ M). Des extraits nucléaires sont ensuite préparés selon le protocole décrit au **point 3.5.1** en vue de réaliser le dosage de l'activité des DNMTs. Le dosage protéique a été réalisé selon le protocole décrit au **point 3.5.2**. Pour le dosage de l'activité des DNMTs, il est recommandé d'utiliser entre 0,5 μ g et 10 μ g de protéines nucléaires par test (Active Motif, USA). Un volume correspondant à une quantité de 5 μ g de protéines nucléaires est donc ajouté au tampon enzymatique complet pour obtenir un volume final de 100 μ l. Les échantillons sont gardés sur glace en attendant le dosage de l'activité des DNMTs.

3.6.3 Préparation de la courbe standard

Au fond des puits sont immobilisés des fragments d'ADN enrichis en CpG. Un volume de 100 μ l de tampon enzymatique complet AM1 est ajouté à chaque puits. Une courbe standard est ensuite préparée par dilution sériée de l'enzyme méthyltransférase fournie avec le kit (Active Motif). Les puits servant de blanc contiennent seulement un volume de 100 μ l de tampon enzymatique complet AM1.

3.6.4 Dosage des activités DNMTs

Une fois 28 μ l d'extraits nucléaires ou de standard ajoutés à un volume de 72 μ l de tampon enzymatique complet AM1, la réaction de méthylation se déroule pendant 2 h à 37 °C avec une agitation modérée (100 rpm) sur un plateau rotatif. Après l'incubation, le mélange réactionnel est décanté et les puits sont rincés à 3 reprises avec un volume de 200 μ l de solution de rinçage AM1 1X (Active Motif). Ensuite, un volume de 100 μ l d'une solution contenant la protéine *polyHis-MBD2b* (Active Motif) est ajouté à chaque puits. La liaison de

Tube	Standard TET (μl)	Tampon enzymatique (μl)	Concentration finale (ng/μl)
1	1	39	0,05
2	1	9	0,20
3	1	3	0,50
4	2	2	1,00
5	4	0	2,00

Tableau 17 : Préparation des solutions standards pour le dosage de l'activité TET.

la protéine aux motifs méthylés est permise suite à une incubation de 45 min à TA et sous agitation légère (100 rpm) sur un plateau rotatif. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec un volume de 200 µl de solution de rinçage AM3 (Active Motif). Ensuite, un volume de 100 µl d'anticorps anti-polyHis-HRP (Active Motif) dilués dans du tampon de liaison de l'anticorps AM3 est ajouté aux puits pendant 45 min avec une agitation modérée (100 rpm) sur un plateau rotatif. Au terme de l'incubation, les puits sont rincés avec un volume de 200 µl de tampon de rinçage AM1. Après un rinçage, un volume de 100 µl de solution de révélation (Active Motif) est ajouté à chaque puits. Après 7 min d'incubation à l'obscurité, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'addition d'un volume de 100 µl de solution d'arrêt de la réaction (Active Motif). En présence de l'acide, la couleur bleue du produit de réaction vire au jaune. L'absorbance du produit de réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (Bio-Rad, USA) (longueur d'onde de référence de 660 nm). L'activité des DNMTs des différents échantillons est enfin calculée suivant l'équation ci-dessous, après avoir calculé la moyenne des doubles techniques de dosage et des blancs :

$$\text{DNMT activity (A/h/}\mu\text{g)} = \frac{(\text{A moyenne de l'échantillon} - \text{A moyenne du blanc}) \times 1000}{(\text{Quantité de protéines (}\mu\text{g)}) \times \text{temps d'incubation (h)}}$$

3.7 Dosage des activités TETs

3.7.1 Principe

Le dosage de l'activité des enzymes TETs a été réalisé à partir d'extraits nucléaires d'adipocytes 3T3-L1 à l'aide du kit *TET Hydroxylase Activity Quantification Kit* (Abcam, USA). Le principe du dosage repose sur l'hydroxylation par les enzymes TETs du substrat méthylé fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits fournie dans le kit. Le produit hydroxyméthylé est ensuite reconnu par un anticorps spécifique. L'ajout d'un anticorps de détection et d'une solution de développement permettra enfin de mesurer l'absorbance qui sera directement proportionnelle à l'activité des enzymes TETs.

3.7.2 Préparation des échantillons

Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans des boîtes T75 (Corning, USA) puis différenciées en adipocytes suivant le protocole décrit au **point 3.1.2**. A la fin de la différenciation, les cellules sont incubées pendant 72 h en présence ou en absence de FCCP (0,5 µM). Des extraits nucléaires sont ensuite préparés selon le protocole décrit au **point 3.5.1**. Le dosage protéique a été réalisé selon le protocole décrit au **point 3.5.2**.

3.7.3 Préparation de la courbe standard de l'activité des TETs

D'abord, un volume de 1 µl de standard TET fourni par la firme est ajouté à un volume de 9 µl de tampon enzymatique TET complet. Ensuite, les solutions standards sont préparées suivant le **Tableau 17**.

3.7.4 Dosage de l'activité des enzymes TETs

Un volume de 80 µl de solution de liaison est ajouté à chaque puits de la plaque 96 puits fournie dans le kit. Ensuite, un volume de 2 µl de substrat TET est ajouté dans chaque

puits (blanc et échantillons). Un volume de 1 µl de standard TET dilué est ajouté aux puits standards correspondant. La plaque est agitée, couverte d'un film plastique puis incubée pendant 90 min à 37°C. Après l'incubation, le mélange réactionnel est éliminé et les puits sont rincés 3 fois avec un volume de 150 µl de tampon de rinçage. Ensuite, un volume de 50 µl de tampon enzymatique TET complet est ajouté dans les conditions « blanc » des standards et standards. Afin d'obtenir 5 µg de protéines d'extraits nucléaires dans les puits échantillons, un volume de 3 µl d'échantillon est utilisé et complété par du tampon enzymatique TET complet pour obtenir un volume de 50 µl. Concernant le blanc des échantillons, un volume de 3 µl du tampon RE/SA est porté à 50 µl avec le tampon enzymatique TET complet. La réaction se déroule pendant 1h30 à 37 °C. Après l'incubation, le mélange réactionnel est éliminé et les puits sont rincés à 3 reprises avec un volume de 150 µl de tampon de rinçage. Un volume de 50 µl d'une solution diluée d'anticorps de capture est alors ajouté à chaque puits et la liaison de l'anticorps est permise pendant 60 min à TA. Au terme de l'incubation, le mélange réactionnel est éliminé et les puits sont rincés à 3 reprises avec un volume de 150 µl de tampon de rinçage. Un volume de 50 µl d'une solution d'anticorps de détection est ajouté à chaque puits. Les puits sont ensuite scellés avec un film plastique et incubés pendant 30 min. Après l'incubation, le mélange réactionnel est éliminé et les puits sont rincés 4 fois avec un volume de 150 µl de tampon de rinçage. Un volume de 50 µl d'une solution de rehaussement est ajouté à chaque puits. Les puits sont ensuite scellés avec un film plastique et incubés pendant 30 min. Après l'incubation, le mélange réactionnel est éliminé et les puits sont rincés à 5 reprises avec un volume de 150 µl de tampon de rinçage. Finalement, un volume de 100 µl de solution de révélation est ajouté à chaque puits. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'addition d'un volume de 50 µl d'une solution d'arrêt de la réaction à chaque puits. L'absorbance du produit de réaction est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (Bio-Rad, USA) (longueur d'onde de référence de 665 nm). Après avoir calculé la moyenne des doubles techniques et des blancs, l'activité des enzymes TETs des différents échantillons est normalisée par rapport à la quantité de protéines présentes dans les extraits nucléaires.

3.8 Analyse statistique

La signification statistique de la différence entre les groupes expérimentaux a été déterminée par un test *T* de Student ou par une ANOVA1. Les données sont exprimées en moyennes +/- l'écart type. *P* values < 0,05 est considérée comme étant statistiquement significatif.

4 Résultats et discussion

4.1 Effet du découplage mitochondrial sur l'expression d'adipokines

Depuis 1994 et la découverte de la production de la leptine par le tissu adipeux (Zhang et al., 1994), de nombreuses recherches se sont portées sur l'identification de nouvelles adipokines au point que le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un organe à fonction endocrine (Maury et Brichard, 2010). Ce concept a été initialement proposé suite à l'observation d'une communication moléculaire inter-cellulaire entre des adipocytes et des myocytes humains en co-culture (Dietze et al., 2002). A l'heure actuelle, plus de 400 protéines sécrétées par les adipocytes primaires humains ont été identifiées regroupant des cytokines classiques et des chémokines, des facteurs de croissance et de coagulation, des régulateurs du métabolisme des lipoprotéines, et des protéines plus spécifiquement sécrétées par les adipocytes blancs comme la leptine ou l'adiponectine (Romacho et al., 2014). Les profils d'expression et de sécrétion de ces adipokines sont modifiés chez les individus obèses ce qui peut mener à l'apparition de symptômes caractéristiques comme l'inflammation modérée chronique ou contribuer au développement de maladies métaboliques comme le diabète de type II (Romacho et al., 2014). Ces adipokines sont donc considérées maintenant comme des molécules de communication entre le tissu adipeux et d'autres organes et pourraient être les médiateurs conduisant aux symptômes du syndrome métabolique (Guilherme et al., 2008).

Bien que le découplage mitochondrial ciblé, contrôlé et assorti d'une stimulation de la β -oxydation des acides gras libérés par d'autres organes comme le tissu adipeux brun, les cellules musculaires squelettiques, cardiaques ou rénales pourrait être bénéfique dans le contexte de la lutte contre l'obésité pour son effet bénéfique sur le métabolisme et la prise de poids comme l'attestent des études sur les souris transgéniques *aP2-Ucp1* ou des adipocytes 3T3-L1 (Kopecky et al., 1995; Rossmeisl et al., 2005) (Tejerina et al., 2009), l'effet d'un découplage mitochondrial sur la fonction endocrine des adipocytes est encore peu connu.

Des données préliminaires obtenues au laboratoire par Aurélia De Pauw révèlent qu'un découplage mitochondrial modéré mais chronique dans des adipocytes 3T3-L1 diminue l'expression et la sécrétion de plusieurs adipokines comme la leptine, l'adiponectine et la résistine (2010, thèse de doctorat). Une analyse transcriptomique en utilisant un damier à ADN (Affymetrix) suivie d'une validation par RT-qPCR ont permis de valider ces résultats. De plus, il est intéressant de noter que la diminution d'expression de ces adipokines obtenue pour des adipocytes exposés au FCCP est également observée pour des adipocytes stimulés par le $\text{TNF}\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire retrouvée à forte concentration dans les tissus adipeux blancs d'individus obèses (Maury et al., 2009). En stimulant la lipolyse, le $\text{TNF}\alpha$ induit également une réduction du contenu en TG/TAG dans les adipocytes 3T3-L1 (Green et al., 1994). Le $\text{TNF}\alpha$, dont les effets sur la cellule adipeuse sont bien documentés (Ruan et al., 2002) et en partie comparables à ceux obtenus pour le découplage mitochondrial est donc utilisé comme contrôle dans l'analyse des profils d'expression (Tejerina et al., 2009).

Dans le but d'étendre l'analyse du profil d'expression à d'autres adipokines, l'abondance relative du transcrit des gènes codant pour l'angiotensinogène, l'apéline, la

chémérine, la TSP-1 et le SAA1 a été mesurée dans des adipocytes exposés au FCCP ou stimulés par le TNF α pendant 1, 3 ou 6 jours (**Figure 1**).

Concernant la leptine, l'adiponectine, la résistine et l'angiotensinogène, nous pouvons d'abord noter que les niveaux d'expression de ces adipokines augmentent très fortement (induction) dans les adipocytes 3T3-L1 comparés aux pré-adipocytes (**Figure 1 A, C, E, G**). De plus, l'expression de ces cytokines est fortement et significativement diminuée dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNF α et ce dès 24 h d'incubation. Cette diminution est maintenue pour des temps de 72 et 144 h d'incubation par rapport à la condition contrôle (adipocytes non traités) (**Figure 1 B, D, F, H**).

Le niveau d'expression de la leptine augmente fortement dans les adipocytes 3T3-L1 comparé aux pré-adipocytes (**Figure 1A**). Il est en effet bien connu que l'expression de la leptine (et d'autres adipokines) est augmentée au cours de la différenciation cellulaire et qu'elle est le résultat d'une activation du facteur de transcription PPAR γ et C/EBP α (Melnzer et al., 2001). De plus, dans un autre modèle de découplage, Kraus et ses collaborateurs ont observé un changement d'expression présentant une corrélation négative entre la leptine et UCP-1 (Kraus et al., 2005). En effet, ces auteurs montrent que la stimulation d'adipocytes bruns en culture avec de l'aldostérone, un minéralocorticoïde impliqué dans la différenciation des adipocytes médiée par le récepteur nucléaire MR (*Mineralocorticoïde receptor*) (Caprio et al., 2007), induit une inhibition de l'expression d'UCP-1 d'une manière dépendante de la concentration alors que l'expression de la leptine augmente considérablement (Kraus et al., 2005).

L'incubation d'adipocytes 3T3-L1 en présence de TNF α révèle aussi son effet répresseur sur l'expression de la leptine (**Figure 1B**). Ce résultat est en accord avec l'étude de Granowitz qui montre une diminution de l'expression de la leptine d'une manière dépendante de la concentration en TNF α et qui propose un type de « dé-différenciation » des adipocytes 3T3-L1 en réponse aux cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-11 ou le TNF α (Granowitz, 1997). De nouveau, une diminution de l'expression (Ruan et al., 2002) et de l'activité transactivatrice de C/EBP α (Granowitz, 1997) en réponse au TNF α pourrait être responsable de cette diminution de l'expression de la leptine.

Tout comme pour la leptine, le profil d'expression de l'adiponectine révèle une forte induction de son expression dans les adipocytes 3T3-L1 par rapport aux pré-adipocytes (**Figure 1C**). De plus, le profil d'expression de l'adiponectine en réponse au FCCP ou au TNF α est comparable à celui obtenu pour la leptine dans ces conditions (**Figure 1D**). Il a déjà été montré que le traitement d'adipocytes 3T3-L1 avec 20 ng/ml de TNF α conduit à une forte diminution de l'expression de l'adiponectine (Sakurai et al., 2008 ; Tejerina et al., 2009). Le mécanisme serait dépendant de l'activation de la JNK (*c-Jun N terminale kinase*), une sérine/thréonine kinase capable d'induire la suppression de l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes 3T3-L1 (Kim et al., 2005). Le résultat de ces études est compatible avec le profil d'expression que nous observons en réponse au TNF α (10 ng/ml) (**Figure 1D**).

Une étude rapporte que l'adiponectine est exprimée par des adipocytes bruns *in vitro* (lignée T37i) exprimant UCP-1 bien que l'activité de découplage mitochondrial n'a pas été mesurée. En revanche, l'incubation des adipocytes bruns en présence de glucocorticoïdes et de ligands β -adrénergiques (lequel mime l'exposition au froid) induit une forte répression de l'expression de l'adiponectine (Viengchareun et al., 2002). Ces résultats sont en lien avec la

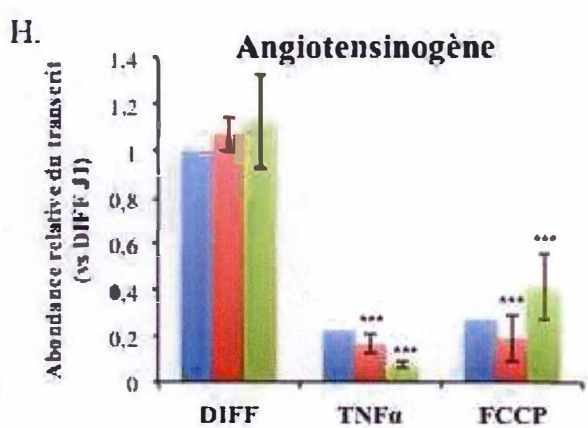
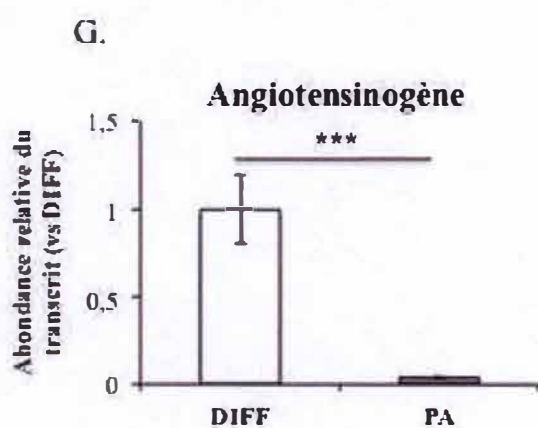
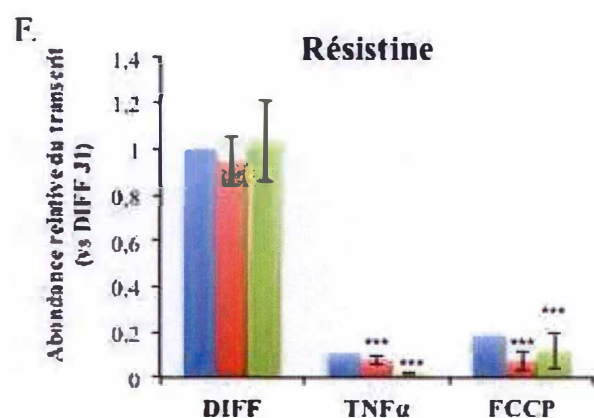
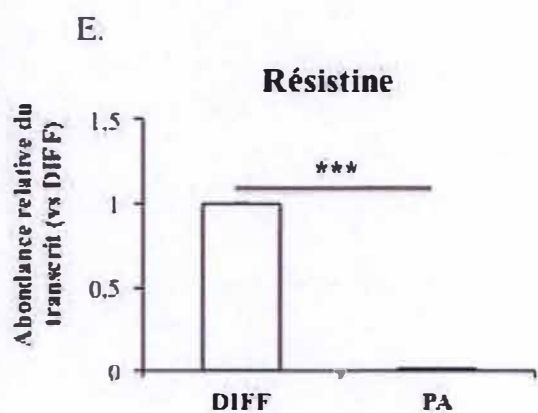
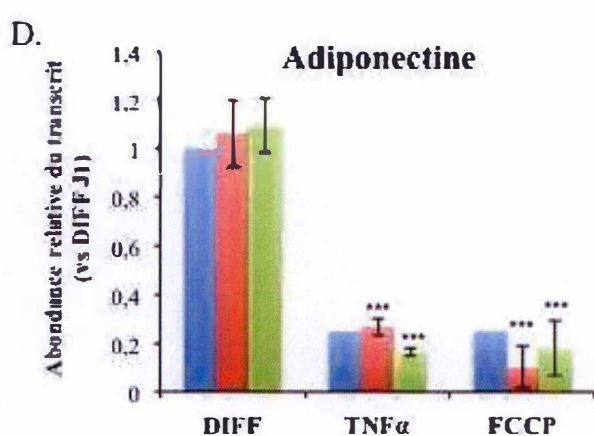
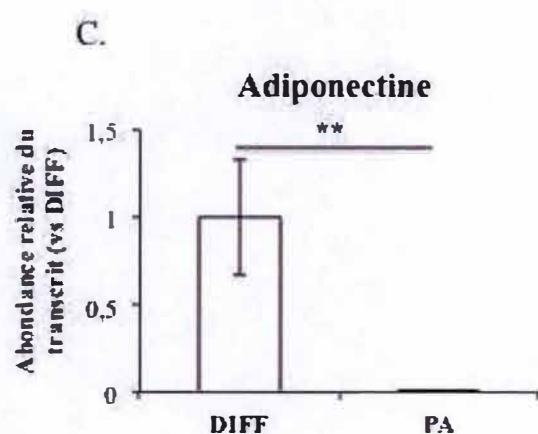
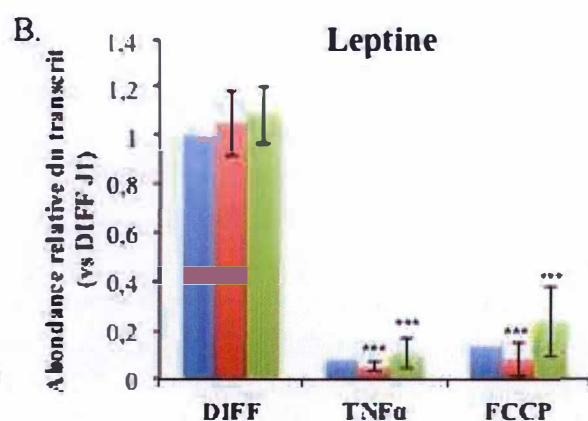
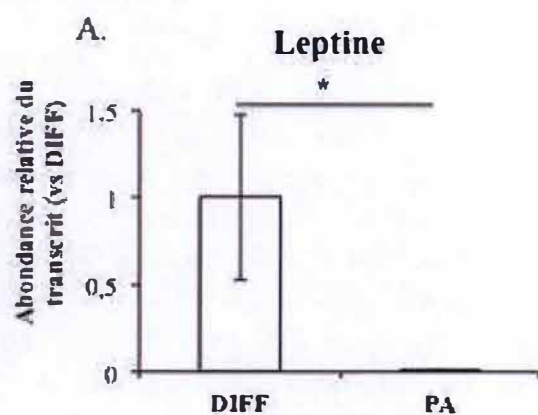


Figure 1 : Effet du TNF α ou du FCCP sur l'expression de la leptine, de l'adiponectine, de la résistine et de l'angiotensinogène dans les adipocytes 3T3-L1.

Les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés pendant 1 jour (J1, bleu), 3 jours (J3, rouge) ou 6 jours (J6, vert) avec du milieu complet en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M FCCP (FCCP) ou de 10 ng/ml TNF α (TNF α). A la fin du traitement, une extraction d'ARN total et une reverse transcription des ARNm en ADNc ont été réalisées dans le but d'évaluer l'abondance du transcrit des différentes adipokines candidates par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en abondance relative du transcrit par rapport aux adipocytes non traités (DIFF) incubés dans un milieu complet pendant 72 h (A, C, E, G), pendant 24 h après la fin de la différenciation (J1) (B, D, F, H). Le transcrit de TBP ("*TATA-box binding protein*") a été utilisé en tant que « *house keeping gene* ». Les résultats représentent la moyenne \pm 1 écart type. Chaque colonne représente la moyenne de 3 expériences indépendantes (excepté pour la condition 1 jour de traitement (graphique B, D, F, H) pour laquelle 2 réplicats ont été analysés). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$; significativement différent de la condition DIFF.

diminution de l'expression de l'adiponectine observée suite au découplage mitochondrial induit par le FCCP (**Figure 1D**). Au niveau transcriptionnel, la stimulation de PPAR γ avec des ligands est connue pour réguler positivement l'expression de l'adiponectine (Rangwala et Lazar, 2004). Ainsi, la diminution d'expression de l'adiponectine observée en réponse au FCCP pourrait provenir d'une inhibition de l'activité de PPAR γ ou d'une altération de son recrutement au site de liaison suite à un remodelage de la chromatine.

Comme précédemment montré dans la littérature au cours de l'adipogenèse (Steppan et al., 2001), nous observons que le niveau d'expression de la résistine dans les adipocytes est très supérieur à celui des pré-adipocytes (**Figure 1E**). Concernant l'effet du traitement au TNF α qui provoque une répression de l'expression de l'adipokine (**Figure 1F**), Fasshauer et ses collaborateurs ont également montré une réduction de l'expression de la résistine dans les adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de TNF α (Fasshauer et al., 2001). Nous montrons en plus que la diminution d'expression est maintenue au cours de la période d'incubation pendant au moins 6 jours.

Concernant l'effet du découplage mitochondrial sur l'expression de la résistine, une diminution hautement significative est observée et ce quel que soit le temps d'incubation des cellules avec le FCCP (**Figure 1F**). En lien avec le découplage physiologique dû à l'activation d'UCP-1, l'expression de la résistine diminue aussi fortement dans le tissu adipeux brun murin de souris mâles C57BL/6J (Steppan et al., 2001). De plus, la stimulation d'adipocytes bruns avec des ligands β -adrénergiques, mimant une exposition au froid, induit également une diminution de l'expression de la résistine (Viengchareun et al., 2002).

L'expression de l'angiotensinogène est également plus élevée dans les adipocytes 3T3-L1 par rapport aux pré-adipocytes (**Figure 1G**), un résultat en accord avec une étude qui révèle une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'angiotensinogène au cours de la différenciation des adipocytes (Saint-Marc et al., 2001). Une diminution de l'expression de l'angiotensinogène est également observée en réponse à une stimulation par le TNF α ou le FCCP (**Figure 1H**), des données en accord avec la littérature pour la stimulation par la cytokine pro-inflammatoire (Ruan et al., 2002).

En accord avec le profil d'expression de l'angiotensinogène en réponse à l'induction d'un découplage mitochondrial (**Figure 1H**), il a été montré que l'expression de l'angiotensinogène est réprimée dans des adipocytes bruns différenciés (Kajimura et al., 2008). Ces auteurs se sont particulièrement intéressés au mécanisme de régulation transcriptionnelle dans ces conditions et suggèrent que le facteur de transcription PRDM16 serait un régulateur majeur de l'expression génique au sein de la graisse brune. En effet, en complexe avec le co-répresseur CtBP (*C-terminal-binding protein*), PRDM16 diminue l'expression des gènes spécifiques des adipocytes blancs comme l'angiotensinogène ou la résistine alors que l'interaction entre PRDM16 et le co-activateur PGC-1 α favoriserait l'expression de gènes spécifiques des adipocytes bruns comme UCP-1 (Kajimura et al., 2008). Vernochet et ses collaborateurs sont arrivés à la même conclusion dans un modèle de « trans-différenciation » des adipocytes blancs en adipocytes bruns par traitement à la troglitazone, un ligand synthétique de PPAR γ (Vernochet et al., 2009).

Suite à l'induction d'un découplage mitochondrial, et bien que diminuée, aucun changement significatif de l'expression de l'apéline n'est observé en réponse au FCCP après 3 ou 6 jours de traitement. Le point expérimental 24 h ne comportant que deux échantillons ne

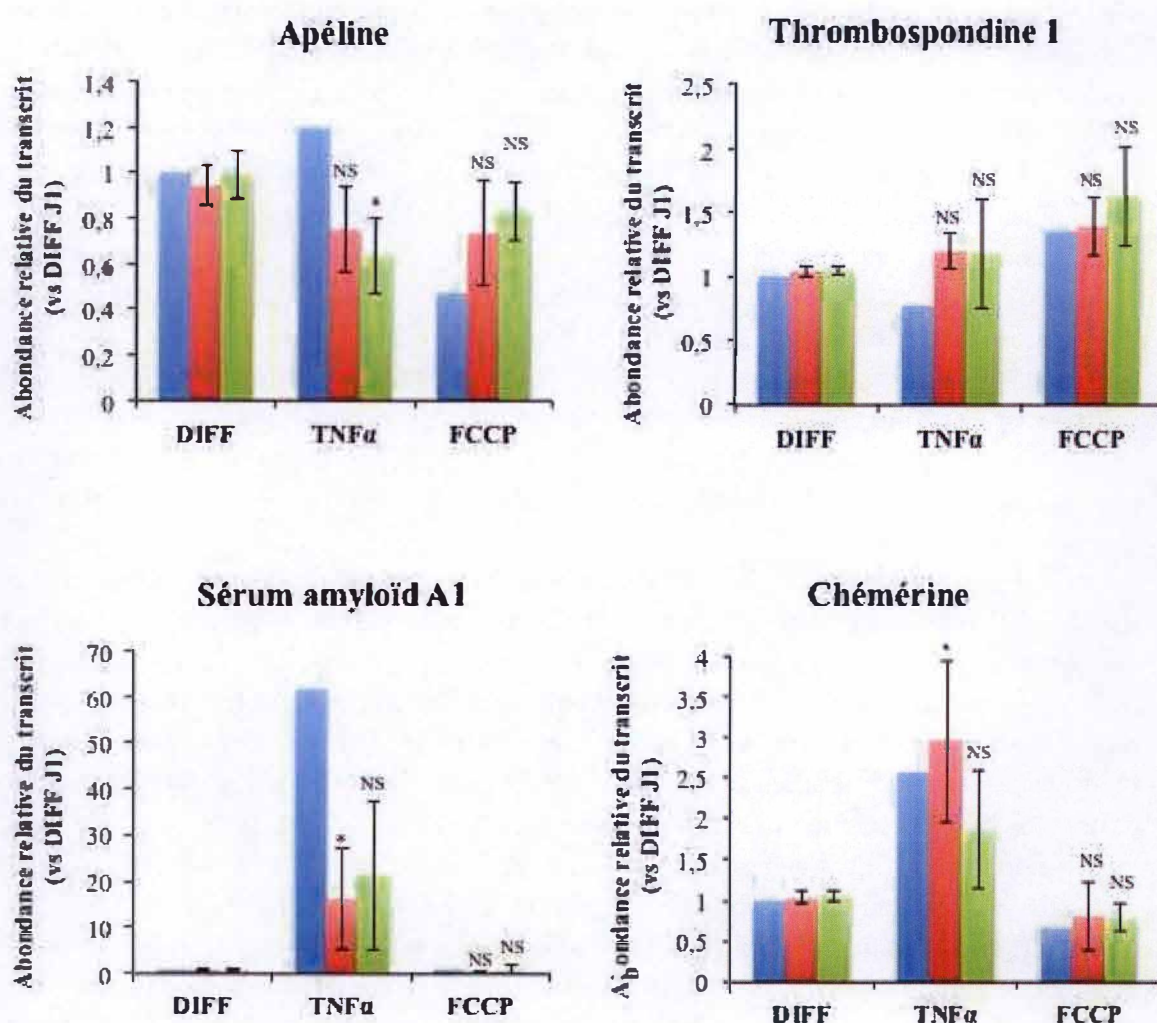


Figure 2 : Effet du $TNF\alpha$ ou du FCCP sur l'expression de l'apéline, de la thrombospondine-1, du sérum amyloïd A1 et de la chémérine dans les adipocytes 3T3-L1.

Les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés pendant 1 jour (J1, bleu), 3 jours (J3, rouge) ou 6 jours (J6, vert) avec du milieu complet en absence (DIFF) ou en présence de $0,5 \mu M$ FCCP (FCCP) ou de 10 ng/ml $TNF\alpha$ ($TNF\alpha$). A la fin du traitement, une extraction d'ARN total et une reverse transcription des ARNm en ADNc ont été réalisées dans le but d'évaluer l'abondance du transcrit des différentes adipokines candidates par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en abondance relative du transcrit par rapport aux adipocytes non traités (DIFF) incubés dans un milieu complet pendant 24 h après la fin de la différenciation (J1). Le transcrit de TBP ("TATA-box binding protein") a été utilisé en tant que « house keeping gene ». Les résultats représentent la moyenne ± 1 écart type. Chaque colonne représente la moyenne de 3 expériences indépendantes (excepté pour la condition 1 jour de traitement) pour laquelle 2 réplicats ont été analysés). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$; significativement différent de la condition DIFF.

permet pas de réaliser de test statistique, malgré une forte diminution de l'expression de l'apéline par les cellules incubées en présence de FCCP (**Figure 2**).

L'effet du TNF α sur l'expression de l'apéline semble dépendre du temps d'incubation puisqu'un traitement prolongé semble diminuer significativement son expression, après 6 jours d'incubation (**Figure 2**). Remarquons que la petite sur-expression temporaire au cours des 24 h pourrait ne pas être un artéfact puisqu'une étude montre qu'une incubation d'adipocytes murins 3T3F442A en présence de TNF α (10 ng/ml) pendant 8 h induit une augmentation significative de l'expression de l'apéline par rapport aux adipocytes 3T3F442A non traités (Daviaud et al., 2006). Connaissant la corrélation positive qui existe entre l'accumulation de TNF α dans le tissu adipeux et la résistance à l'insuline (Guilherme et al., 2008) et sur base des propriétés hypoglycémiantes de l'apéline (Zhu et al., 2011), une diminution de l'expression de l'apéline suite à une incubation prolongée en présence de TNF α pourrait contribuer à l'installation de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques chez les individus obèses.

Le profil d'expression de la TSP-1 ne présente aucune augmentation significative en réponse au TNF α ou au FCCP par rapport aux adipocytes non traités (**Figure 2**). La TSP-1 est connue pour exercer son action pro-inflammatoire en recrutant des macrophages au sein des tissus adipeux blancs d'individus obèses (Varma et al., 2008). Nous montrons que l'incubation d'adipocytes 3T3-L1 en présence de TNF α ou de FCCP ne conduit pas à une augmentation significative de l'expression de la TSP-1 (**Figure 2**). Notons qu'une étude récente a rapporté que la stimulation d'adipocytes 3T3-L1 avec le TNF α n'affecte pas le niveau d'expression de la TSP-1 (Kong et al., 2013), ce qui est en accord avec le profil d'expression obtenu en réponse au TNF α .

L'expression du SAA1 est fortement induite en réponse au TNF α mais pas en réponse au découplage mitochondrial par rapport aux adipocytes contrôles (**Figure 2**). Ce résultat est en accord avec les fonctions pro-inflammatoires de SAA1 puisque cette protéine augmente l'expression du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-8 dans le cadre de l'obésité conduisant à un état inflammatoire chronique léger au sein du tissu adipeux viscéral (Yang et al., 2006).

Nous montrons donc un effet important du TNF α sur l'expression de SAA1 dans les adipocytes 3T3-L1. Sachant que le SAA1 active la lipolyse dans les adipocytes 3T3-L1 suite à une diminution d'expression de régulateurs adipogéniques comme C/EBP β , C/EBP α , PPAR γ 2, GLUT4, FABP4 et périlipine (Chen et al., 2008; Filippin-Monteiro et al., 2012), il est possible que la diminution du contenu en TG/TAG observée dans les adipocytes 3T3-L1 en réponse au traitement au TNF α (Tejerina et al., 2009) soit médiée, en partie du moins, par cette sur-expression de SAA1. Ainsi, l'expression différentielle de SAA1 entre les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNF α (**Figure 2**) pourrait représenter un exemple de mécanisme moléculaire propre au TNF α dans l'induction de la « dé-différenciation ».

Finalement pour la chémérine, le niveau d'expression augmente dans les adipocytes stimulés par le TNF α après 3 jours de traitement (**Figure 2**). Parlee et ses collaborateurs montrent également que l'expression de la chémérine est activée dans les adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de TNF α (Parlee et al., 2010). Cet effet stimulateur du TNF α sur l'expression de la chémérine a également été rapporté dans des adipocytes viscéraux humains (Catalan et al., 2013).

En réponse au découplage mitochondrial induit par le FCCP, aucun changement significatif d'expression de la chémerine n'est observé au cours de la période de traitement (**Figure 2**). La régulation de l'expression de la chémerine dans le tissu adipeux brun activé par le froid ou par un régime alimentaire riche en graisses chez des souris mâles NMRI a été récemment examinée par l'équipe de Nedergaard (Hansen et al., 2014). Les auteurs ont notamment associé une répression de l'expression de la chémerine dans le tissu adipeux brun interscapulaire activé en réponse à une diminution de la température environnementale, induisant une augmentation de l'expression d'UCP-1. Une diminution de l'expression de la chémerine a également été mesurée dans le tissu adipeux blanc inguinal connu pour former des adipocytes beiges en réponse à une exposition au froid. En revanche, l'expression de la chémerine augmente chez des souris mâles NMRI nourries avec un régime riche en graisses (Hansen et al., 2014). Cette augmentation d'expression pourrait être expliquée par une élévation de la concentration en TNF α plasmatique dont l'effet stimulateur sur l'expression de la chémerine dans les adipocytes est connu (**Figure 2**) (Parlee et al., 2010).

4.2 Effet du découplage mitochondrial sur l'activité enzymatique des DNMTs et des HDACs

Une donnée préliminaire importante obtenue par le laboratoire montre que l'induction d'un découplage mitochondrial dans les adipocytes 3T3-L1 entraîne une diminution significative de l'activité transactivatrice du facteur de transcription PPAR γ (Tejerina et al., 2009). En vue de limiter la diminution de l'expression des adipokines étudiées induite par le traitement au FCCP, les adipocytes 3T3-L1 ont été traités avec le FCCP et incubés en présence ou en absence d'une combinaison de deux activateurs de PPAR γ et de RXR : la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ et l'acide 9 cis-rétinoïque, un agoniste de RXR, le partenaire d'hétérodimérisation. De manière surprenante, l'incubation en présence des deux ligands, qui activent bien le facteur PPAR γ , ne limite pas la diminution de l'expression de la plupart des gènes cibles de PPAR γ , tels que les gènes codant pour les adipokines étudiées dans le cadre de ce mémoire. Ces résultats suggèrent que la modulation de l'expression observée en réponse au FCCP pourrait provenir d'un niveau de régulation indépendant de PPAR γ . Ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'induction d'un découplage mitochondrial pourrait induire des changements épigénétiques (et/ou un remodelage de la chromatine) capables de contrôler l'expression des gènes codant pour les adipokines d'intérêt.

L'implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'activité du promoteur de la leptine a fait l'objet de plusieurs études que ce soit chez la souris ou chez l'homme. Yokomori et ses collaborateurs ont notamment montré une déméthylation globale de ce promoteur au cours de la différenciation des adipocytes 3T3-L1, corrélée à une augmentation de l'abondance du transcrit du gène (Yokomori et al., 2001). Le fragment du promoteur de la leptine analysé par les auteurs (-159 à -54 par rapport au site d'initiation de la transcription) comporte 8 sites CpG dont 7 sont déméthylés au cours du processus de différenciation alors que le site CpG localisé au sein du site de liaison de C/EBP α (-54) reste hautement méthylé dans les cellules différenciées. Ce site de liaison est par ailleurs très conservé parmi les mammifères (Stoger et al., 2006).

Concernant la régulation épigénétique de l'expression du gène codant pour l'adiponectine dans les adipocytes 3T3-L1, ce sont davantage des MPTs des histones qui ont

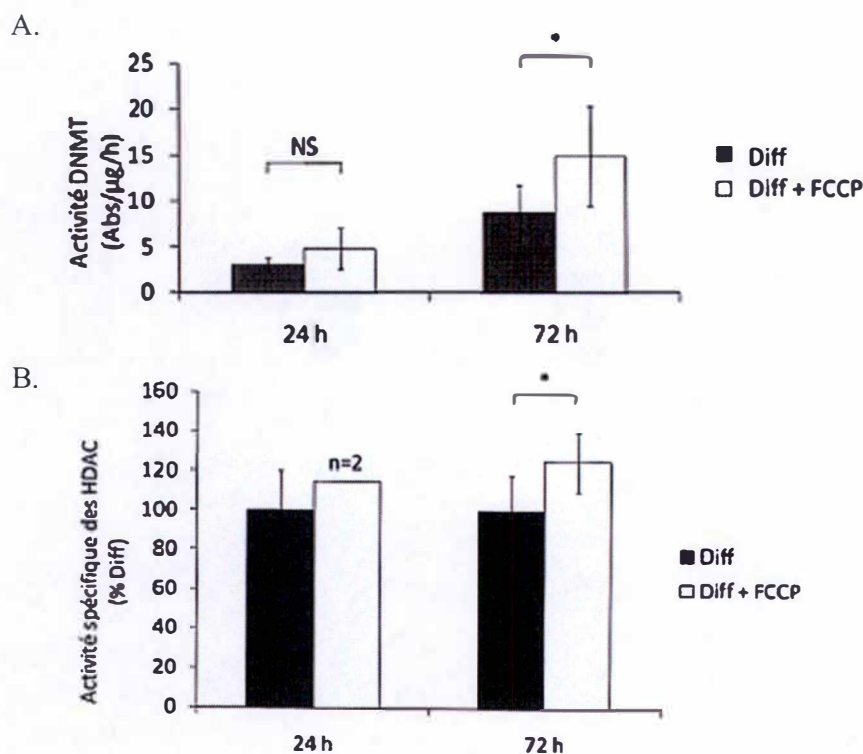


Figure 3 : Effet du FCCP sur l'activité des DNMTs et HDACs (A.-S. Gathy, mémoire, 2013).

Au bout des 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés pendant 24 ou 72 h en présence du milieu complet en absence ("DIFF") (colonne noire) ou en présence de 0,5 μ M FCCP ("DIFF + FCCP") (colonne blanche). Le milieu est renouvelé toutes les 24 heures. A la fin de l'incubation, l'activité des DNMTs (A.) et HDACs (B.) dans la fraction nucléaire des adipocytes est déterminée par un dosage enzymatique. **A.** Le résultat est exprimé comme un ratio entre l'absorbance (450 nm) normalisé par l'abondance des protéines nucléaires présentes et engagées dans le test (Active Motif). Le graphe représente la moyenne \pm 1 écart-type ($n = 3$ échantillons indépendants pour 24 h; $n = 6$ échantillons indépendants pour 72 h). NS : non significativement différent ($P > 0,05$) ; * : significativement différent ($P < 0,05$) comme déterminé par un test T de Student. **B.** Le résultat est exprimé comme le pourcentage de l'activité HDACs par rapport aux adipocytes non traités. Le graphe représente la moyenne \pm 1 écart-type ($n = 2$, ou 3 échantillons indépendants). NS : non significativement différent ($P > 0,05$) ; * : significativement différent ($P < 0,05$) comme déterminé par un test T de Student.

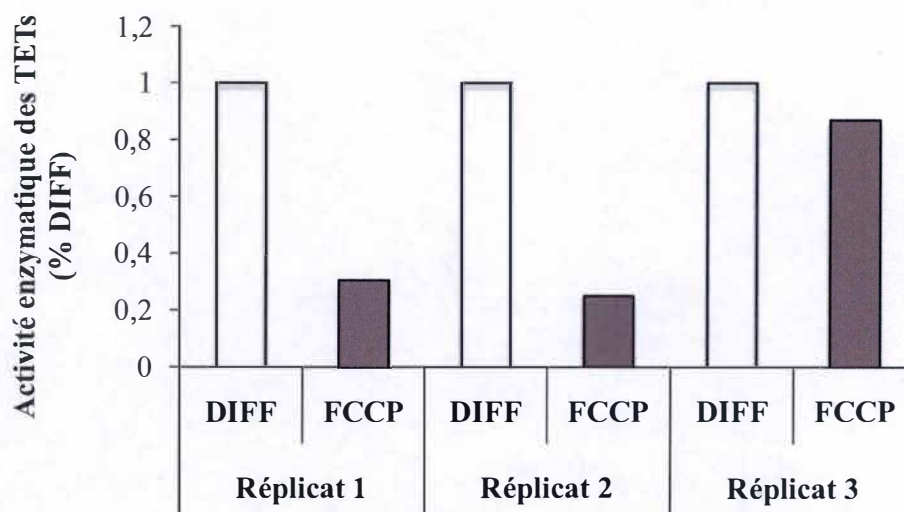


Figure 4 : Effet du FCCP sur l'activité enzymatique des TETs dans les adipocytes 3T3-L1.

Les adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés pendant 12 jours puis incubés pendant 72 h avec du milieu complet en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M FCCP (FCCP). A la fin du traitement, une extraction de protéines nucléaires et une resuspension dans du tampon SA ont été effectuées en vue d'analyser l'activité enzymatique des TETs (voir section « Matériel et Méthodes »). Pour chaque réplicat, les valeurs de l'activité enzymatique des TETs dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ont été exprimées par rapport aux valeurs obtenues pour les adipocytes incubés en absence de FCCP. A la fin de l'expérience, l'absorbance (reflétant l'activité enzymatique) des TETs a été mesurée. Ces résultats sont exprimés en % de l'activité obtenue pour des adipocytes non traités (DIFF).

été mises en évidence dans la modulation du niveau d'expression de cette adipokine comme l'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9ac) (Sakurai et al., 2009). Chez l'homme, l'effet de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de l'adiponectine sur la régulation transcriptionnelle n'est pas encore bien compris même si des études ont établi une corrélation négative entre la fréquence de méthylation du site CpG (-274 par rapport au site d'initiation de la transcription) du promoteur de l'adiponectine de leucocytes périphériques, et le développement de l'obésité associé à la résistance à l'insuline observés sur une cohorte de 106 adolescents (Garcia-Cardona et al., 2014). Un autre site CpG (-74) a été retrouvé dans le promoteur de l'adiponectine mais aucune association n'a pu être établie entre sa fréquence de méthylation et la résistance à l'insuline (Garcia-Cardona et al., 2014). Récemment, Houde et ses collaborateurs ont montré que le pattern de méthylation entre le tissu adipeux viscéral, le tissu adipeux sous-cutané et les cellules sanguines humaines est similaire pour les différents sites CpG analysés (Houde et al., 2014).

A la vue de ces connaissances très fragmentaires portant sur la régulation épigénétique de l'expression d'adipokines, nous émettons l'hypothèse qu'une modification de la régulation épigénétique de l'expression de plusieurs adipokines survient dans les adipocytes en réponse au découplage mitochondrial provoqué par une incubation en présence de FCCP. Ces conditions pourraient donc résulter d'une modification de l'activité et/ou du recrutement des enzymes capables de modifier l'état de méthylation de l'ADN et/ou de la chromatine comme les DNMTs, les HDACs ou les TETs. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'activité des DNMTs dans les adipocytes exposés au FCCP est significativement augmentée (**Figure 3A**) après 72 h de traitement. Une augmentation de l'activité des HDACs (**Figure 3B**) a également été observée après 72 heures d'incubation en présence de FCCP (A.-S. Gathy, mémoire, 2013). Bien que la variabilité soit importante, l'induction d'un découplage mitochondrial semble également diminuer l'activité des enzymes TETs après 72 h d'incubation des adipocytes 3T3-L1 en présence de FCCP (**Figure 4**).

L'augmentation d'activité globale des DNMTs et des HDACs ainsi que la possible diminution de l'activité des TETs dans les adipocytes incubés en présence de FCCP suggère que l'induction d'un découplage mitochondrial pourrait mener à des changements d'activité enzymatique potentiellement compatibles avec des modifications épigénétiques de l'ADN dans le promoteur de gènes codant pour plusieurs adipokines. C'est ce que nous avons tenté de vérifier dans la suite de ce travail.

4.3 Effet du découplage mitochondrial sur l'abondance relative du transcrit des DNMTs

Afin de rechercher si l'augmentation de l'activité des DNMTs mesurée en réponse au FCCP est attribuable à une augmentation de l'expression des DNMTs, nous avons décidé d'analyser son profil d'expression dans des adipocytes exposés au FCCP pendant 1 ou 3 jours d'incubation par rapport à des adipocytes non exposés à l'agent de découplage. L'analyse du profil d'expression révèle que les DNMTs ne semblent pas être affectées par l'induction du découplage mitochondrial dans les adipocytes 3T3-L1 (**Figure 5A, B, C**). Alors que les adipocytes incubés en présence de TNF α pendant 3 jours présentent une abondance relative du transcrit de la DNMT3a 4 fois plus élevée que les adipocytes incubés en absence de FCCP, l'induction d'un découplage mitochondrial ne semble pas modifier l'expression de la

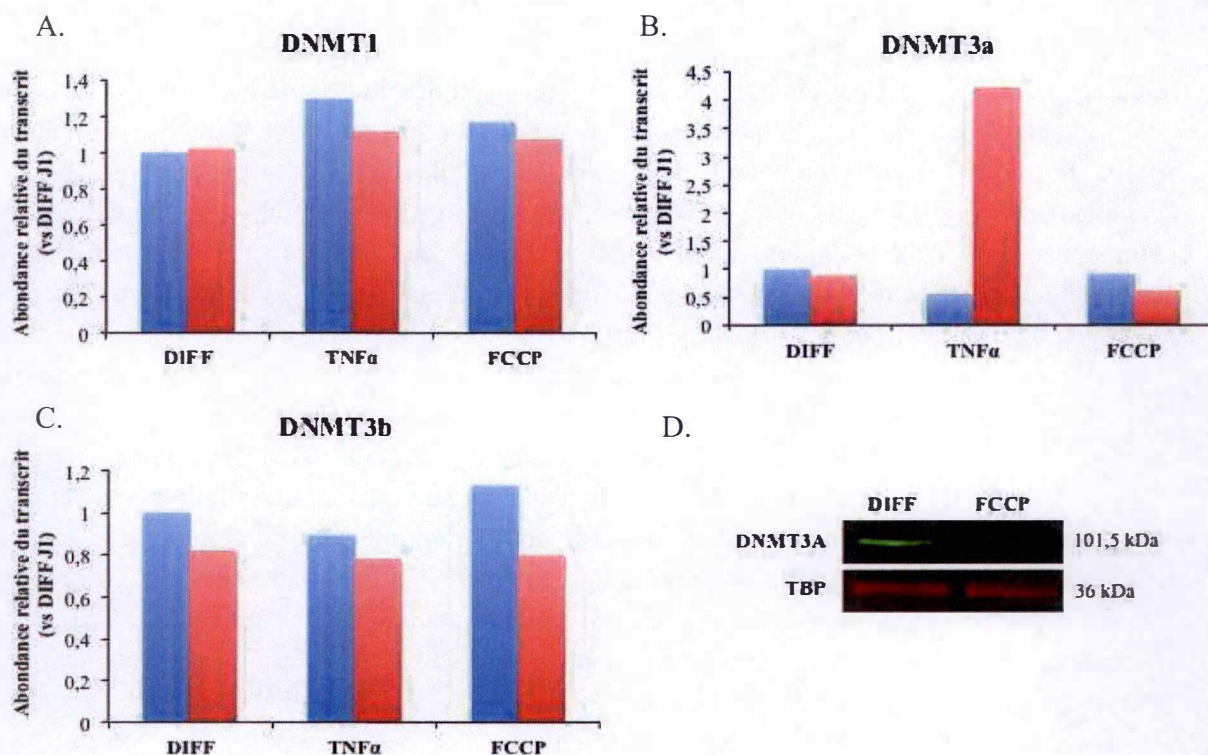


Figure 5 : Effet du TNF α ou du FCCP sur l'expression des DNMTs et effet du FCCP sur l'abondance protéique de la DNMT3a dans des adipocytes 3T3-L1.

(A., B., C.) Analyse de l'expression des DNMTs en RT-qPCR. Des adipocytes 3T3-L1 ont été incubés pendant 1 jour (J1, bleu), 3 jours (J3, rouge) avec du milieu complet en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M de FCCP (FCCP) ou de 10 ng/ml de TNF α (TNF α). A la fin du traitement, une extraction d'ARNm et une reverse transcription des ARNm en ADNc ont été réalisées dans le but d'évaluer l'abondance relative du transcrit de la DNMT1 (A.), de la DNMT3a (B.) et de la DNMT3b (C.) par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en abondance relative du transcrit par rapport aux adipocytes non traités (DIFF) incubés dans du milieu complet pendant 24 h après la fin de la différenciation (Jour 1). Pour la normalisation des Ct, TBP ("*TATA-box binding protein*") a été utilisé en tant que « *house keeping gene* ». Chaque colonne représente la moyenne de 2 échantillons. (D.) **Abondance protéique de la DNMT3a.** Les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés pendant 3 jours avec du milieu complet en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M de FCCP (FCCP). Après 3 jours de traitement, une extraction de protéines a été effectuée en vue d'analyser l'abondance protéique de la DNMT3a par western blot en fluorescence. L'immunodétection de la protéine TFIID/TBP est utilisée comme contrôle de charge.

DNMT3a. Nous avons remarqué que l'expression de la DNMT3b est plus faible par rapport à la DNMT1 et à la DNMT3a.

4.4 Effet du découplage mitochondrial sur l'abondance protéique des DNMTs et des TETs

Bien que l'expression des DNMTs ne soit pas ou peu affectée par l'induction d'un découplage mitochondrial, nous avons décidé d'analyser l'abondance protéique de la DNMT1 et de la DNMT3a dans les adipocytes incubés en présence de l'agent de découplage. Nous observons une abondance protéique plus faible de la DNMT3a dans les adipocytes incubés en présence de FCCP par rapport aux adipocytes non traités (**Figure 5D**). Ce résultat peut paraître surprenant vu l'augmentation d'activité des DNMTs et indique que l'augmentation d'activité observée en réponse au FCCP pourrait être causée par une MPT activatrice.

En revanche, l'analyse de l'abondance protéique de la DNMT1 n'a pas révélé de bande correspondant à la DNMT1. Ce résultat est compatible avec l'étude de Londono Gentile et ses collaborateurs qui montre que la DNMT1 est régulée à la baisse en fin de différenciation et n'est plus perceptible par western blot (Londono Gentile et al., 2013). Au même titre que la DNMT1, l'analyse de l'abondance protéique des 3 enzymes TETs n'a pu mettre en évidence leur présence dans les adipocytes 3T3-L1 (Fujiki et al., 2013).

Ces données suggèrent que ces enzymes de remodelage de la chromatine doivent être davantage présentes au cours de l'adipogenèse et impliquées dans la régulation épigénétique de gènes adipogéniques.

4.5 Effet du découplage mitochondrial sur la méthylation de l'ADN

La méthylation des îlots CpG est généralement associée à la répression de l'expression du gène. Près de 4000 gènes ont été identifiés comme potentiellement régulés par un changement de la méthylation d'îlots CpG au cours de l'adipogenèse des adipocytes 3T3-L1 montrant l'importance d'analyser ces régions régulatrices (Zhu et al., 2012). Ainsi, dans un premier temps, nous avons recherché la présence d'îlots CpG au sein du promoteur de la leptine, de l'adiponectine et de l'angiotensinogène afin d'analyser leur niveau de méthylation dans les adipocytes incubés en présence ou en absence de FCCP ou de TNF α . Pour y parvenir, nous avons utilisé l'algorithme « Methprimer », lequel nous a permis d'identifier la présence d'îlots CpG au sein du promoteur de la leptine. Le premier îlot CpG se trouve dans le promoteur proximal proche du site de liaison de C/EBP α et le second est localisé dans la région distale du promoteur en aval du site de liaison pour PPAR γ (**Figure 6**). Un îlot CpG a également été identifié dans la région distale du promoteur de l'angiotensinogène à proximité d'un site de liaison de PPAR γ . Par contre, aucun îlot CpG n'a pu être identifié par l'algorithme Methprimer dans le promoteur de l'adiponectine.

En utilisant la conversion au bisulfite qui permet de distinguer les cytosines méthylées des cytosines non méthylées (Patterson et al., 2011), il nous a été possible d'étudier les changements de méthylation de l'ADN au sein de ces différents îlots CpG dans les promoteurs de la leptine et de l'angiotensinogène.

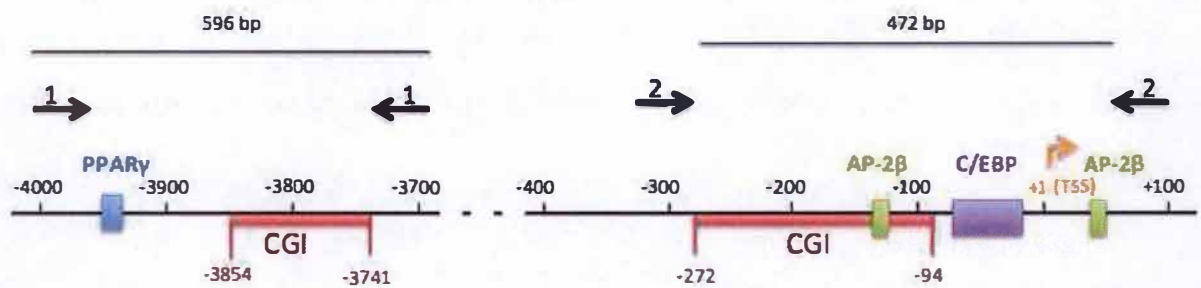


Figure 6 : Organisation des fragments du promoteur de la leptine étudiés.

Le promoteur du gène codant pour la leptine contient une région proximale et une région distale en référence au site (+1) d'initiation de la transcription (TSS). La région proximale (à droite) contient 2 sites de liaison AP-2β (-110 à -101 et +34 à +42), un site de liaison pour C/EBPα (-65 à -5) et un îlot CpG (-272 à -94). La région distale (à gauche) contient un site de liaison pour le facteur PPARγ (-3957 à -3933) ainsi qu'un îlot CpG (-3854 à -3741). Les flèches représentent la localisation des couples de primers utilisés pour l'amplification par PCR nichée dans le but d'analyser le statut de méthylation de l'ADN des 2 îlots CpG putatifs. Le couple de primers 1 et le couple de primers 2 ont été utilisés pour l'amplification du CGI en aval du site de liaison de PPARγ et à proximité du site de liaison de C/EBPα, respectivement. Le TSS (+1) est symbolisé par une flèche.

TSS : *Transcription Initiation Site* ; C/EBPα : *CCAAT Enhancer Binding Protein alpha* ; PPARγ : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma* ; CGI : *CpG island*. AP-2β ou TFAP2β : *Transcription factor AP-2 beta*.

4.5.1 Ilot CpG de la région proximale du promoteur de la leptine

La première région analysée correspond à l'îlot CpG présent au niveau du promoteur proximal, proche du site de liaison de C/EBP α (**Figure 6**). L'analyse du taux de méthylation global de cet îlot CpG révèle une déméthylation significative dans les adipocytes 3T3-L1 par rapport aux pré-adipocytes (**Figure 7A, 7B**). Ces données sont en accord avec les résultats de Yokomori et ses collaborateurs qui montrent une forte diminution de la méthylation de cette région d'ADN au cours de l'adipogenèse (Yokomori et al., 2002).

De manière intéressante, une augmentation hautement significative de la méthylation de l'ADN est observée dans les adipocytes incubés en présence de FCCP par rapport aux adipocytes contrôles (**Figure 7A, 7B**). Le taux de méthylation obtenu pour les adipocytes traités au FCCP est comparable à celui déterminé pour des pré-adipocytes, stade auquel la leptine n'est pas exprimée (Melzner et al., 2002). Ces premières données révèlent que l'induction d'un découplage mitochondrial peut mener à des changements du taux global de méthylation du promoteur proximal de la leptine. Au même titre que le FCCP, le TNF α peut induire une « dé-différenciation » des adipocytes 3T3-L1 caractérisée par une diminution du contenu en TG/TAG et des changements d'expression génique bien que ce processus semble dépendre de PPAR γ (Tejerina et al., 2009). C'est pourquoi, dans la seconde expérience, des adipocytes stimulés par le TNF α ont également été analysés pour la détermination du taux de méthylation global et l'analyse du profil de méthylation des 22 sites CpG (**Figure 7B**). L'incubation des adipocytes 3T3-L1 en présence de TNF α semble également induire une légère (re)méthylation de l'îlot CpG du promoteur proximal bien que la différence ne soit pas statistiquement significative par rapport au taux de méthylation retrouvé dans des adipocytes (**Figure 7B**). En accord avec la première expérience, le FCCP conduit à une augmentation significative de la méthylation par rapport aux adipocytes non traités. La différence du niveau de méthylation entre les adipocytes non traités et les pré-adipocytes (~35%) (**Figure 7B**) est supérieure à celle obtenue pour l'expérience n°1 (~15%) (**Figure 7A**) et pourrait éventuellement être expliquée par une différence dans le pourcentage d'adipocytes différenciés. Ces données établissent donc une corrélation négative entre le taux de méthylation du promoteur proximal de la leptine dans les adipocytes incubés en présence de FCCP et le niveau d'expression de la leptine par les cellules dans ces conditions (**Figure 7**). Ainsi, l'analyse de la méthylation globale nous permet de penser que le découplage mitochondrial induit par le FCCP pourrait réguler l'expression de certaines adipokines étudiées par des modifications épigénétiques comme la méthylation du promoteur.

Il a déjà été rapporté que dans les pré-adipocytes (stade auquel la leptine n'est pas exprimée), 8 sites CpG localisés entre la position -159 et -54 au sein du promoteur de la leptine sont hyperméthylés (> 92 %) (Yokomori et al., 2002). Au cours du processus de différenciation, 7 des 8 sites CpG sont déméthylés alors que le site CpG localisé au sein du site de liaison de C/EBP α (-54) reste hautement méthylé dans les adipocytes 3T3-L1, contrairement aux adipocytes humains où la déméthylation du promoteur est totale (Melzner et al., 2002). Ce site est par ailleurs très conservé parmi les mammifères (Stoger, 2006). En examinant maintenant plus en détail et individuellement les 22 sites CpG dans les fragments d'ADN provenant d'adipocytes non traités par rapport aux pré-adipocytes (**Figure 7C**), nous observons que 9 CpG sont hypométhylés, 1 CpG est hyperméthylé et les 12 autres CpG semblent ne pas être modifiés ou varient dans des directions opposées dans les deux

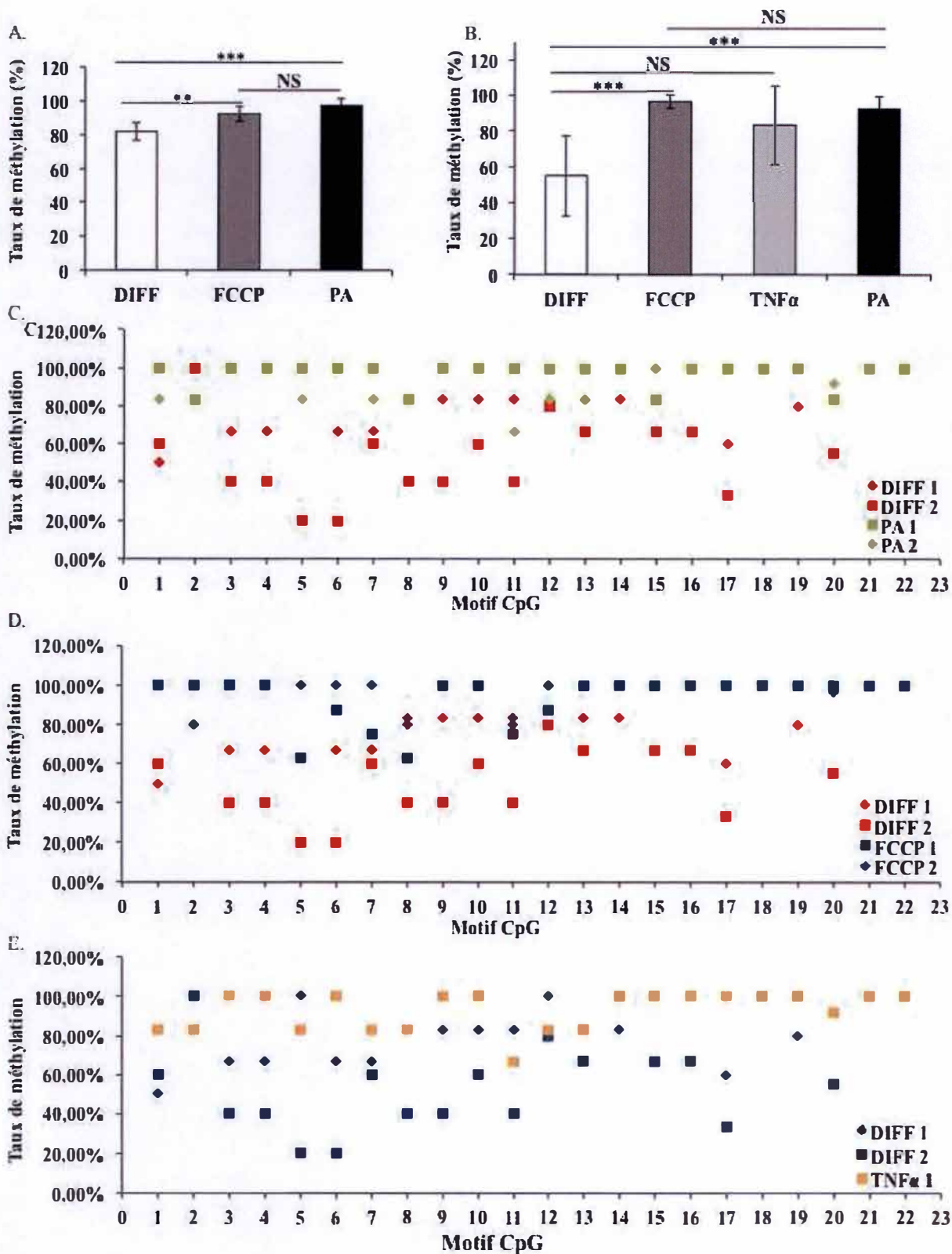


Figure 7 : Effet de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes et d'une incubation des adipocytes en présence de FCCP ou de TNFα sur la méthylation de l'îlot CpG à

proximité du site de liaison de C/EBP α dans le promoteur proximal du gène codant pour la leptine (*Lep*).

Les adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés ou non (PA) pendant 12 jours puis incubés en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M FCCP (FCCP) ou de 10 ng/ml TNF α (TNF α) pendant 72 h. L'ADNg a ensuite été extrait et le niveau de méthylation du promoteur du gène *Lep* a été déterminé par séquençage clonal au bisulfite suivant le protocole décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». **(A.-B.)** Les graphiques représentent le pourcentage moyen de méthylation de l'ADN de l'îlot CpG pour chaque condition testée et ce, pour deux expériences indépendantes. **A.** Le nombre de clones analysés : n = 6 pour « DIFF », 8 pour « FCCP », 6 pour « PA ». **B.** Le nombre de clones analysés : n = 5 clones pour « DIFF », 5 pour « FCCP », 6 pour « TNF α » et 6 pour « PA ». La deuxième expérience intègre en plus des échantillons d'adipocytes traités pendant 72 h avec 10 ng/ml de TNF α . **C.-E.** Les données des 2 expériences sont représentées en probabilité de méthylation pour chaque site CpG (100 % est une indication qui signifie que tous les clones analysés sont méthylés au motif CpG considéré). * $P < 0,05$; significativement différent comme déterminé par un test T de Student.

expériences réalisées. Les 8 sites CpG analysés par Yokomori et ses collaborateurs correspondent aux sites CpG 11 à 18 de l'analyse du profil de méthylation des sites CpG (**Figure 7C-E**). Parmi ces CpG analysés, les auteurs montrent une déméthylation pour 7 CpG, correspondant au CpG 11 à 17 de notre fragment, alors que nous observons une déméthylation pour 6 CpG (CpG 11, CpG 13, CpG 14, CpG 15, CpG 16 et CpG 17). Le CpG 18 correspondant au CpG du site de liaison de C/EBP α reste hautement méthylé après la différenciation (**Figure 7C**) ce qui est compatible avec les résultats rapportés par Yokomori et ses collaborateurs. Par conséquent, la méthylation du CpG au sein du site de liaison de C/EBP α ne semble pas affecter ni la liaison du facteur de transcription ni la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la leptine dans laquelle le facteur C/EBP α jouerait un rôle important (Rishi et al., 2010).

En plus du site de liaison de C/EBP α , le promoteur de la leptine contient également un site de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (-95 à -100), également connu pour réguler positivement l'expression de la leptine (Mason et al., 1998 ; Pietro-Hontoria et al., 2011). Le CpG n°14 de notre profil de méthylation, correspondant au CpG du site de liaison de Sp1, montre une hyperméthylation dans les fragments d'ADN de cellules exposées au FCCP par rapport aux adipocytes non traités (**Figure 7D**). Ce site est également hyperméthylé dans les pré-adipocytes (**Figure 7C**). Ces données indiquent un possible effet répressif de l'hyperméthylation du site CpG 14 dans la régulation de l'expression de la leptine. Cependant, bien que dans un autre contexte, en utilisant une lignée de cellules cancéreuses du poumon H719, Zhu et ses collaborateurs ont analysé l'effet de l'hyperméthylation de l'ADN sur la capacité de liaison de Sp1 dans le promoteur du gène *p21^{Cip1}*, un gène impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Zhu et al., 2003). Les auteurs démontrent que la méthylation du CpG présent au site de liaison de Sp1 ne réduit pas la liaison du facteur de transcription Sp1. En revanche, l'hyperméthylation présente autour du site de liaison de Sp1 diminue significativement sa capacité de liaison. Sur base de ce résultat et en regard de notre profil de méthylation, nous observons qu'au moins 2 sites CpG (n°13 et n°15), de part et d'autre du site CpG n°14, sont hyperméthylés dans les adipocytes en réponse au FCCP (**Figure 7D**). Ces données suggèrent que le découplage mitochondrial induit par le FCCP pourrait altérer la liaison du facteur de transcription Sp1 médiée par une hyperméthylation des sites bordant le site de liaison du facteur de transcription. Cet effet potentiellement répressif de l'hyperméthylation des régions bordantes pourrait également influencer la liaison de C/EBP α en regard des sites hyperméthylés de part et d'autre du CpG 18 en réponse au FCCP (**Figure 7D**). Par conséquent, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de chromatine IP suivies de séquençage (ChIP-seq) dirigées contre les facteurs de transcription Sp1 et C/EBP α afin de déterminer si les changements de méthylation induits par le FCCP peuvent altérer la liaison de ces facteurs de transcription au niveau du promoteur de la leptine.

4.5.2 Ilot CpG de la région distale du promoteur de la leptine

Le taux de méthylation global de l'ilot CpG observé pour les adipocytes non traités est comparable à celui des pré-adipocytes. Le niveau de méthylation est également élevé pour les adipocytes incubés en présence de FCCP mais légèrement inférieur aux pré-adipocytes (bien que la différence ne soit pas significative) et aux adipocytes contrôles alors que pour le traitement des adipocytes avec le TNF α , on maintient une méthylation très élevée, proche de

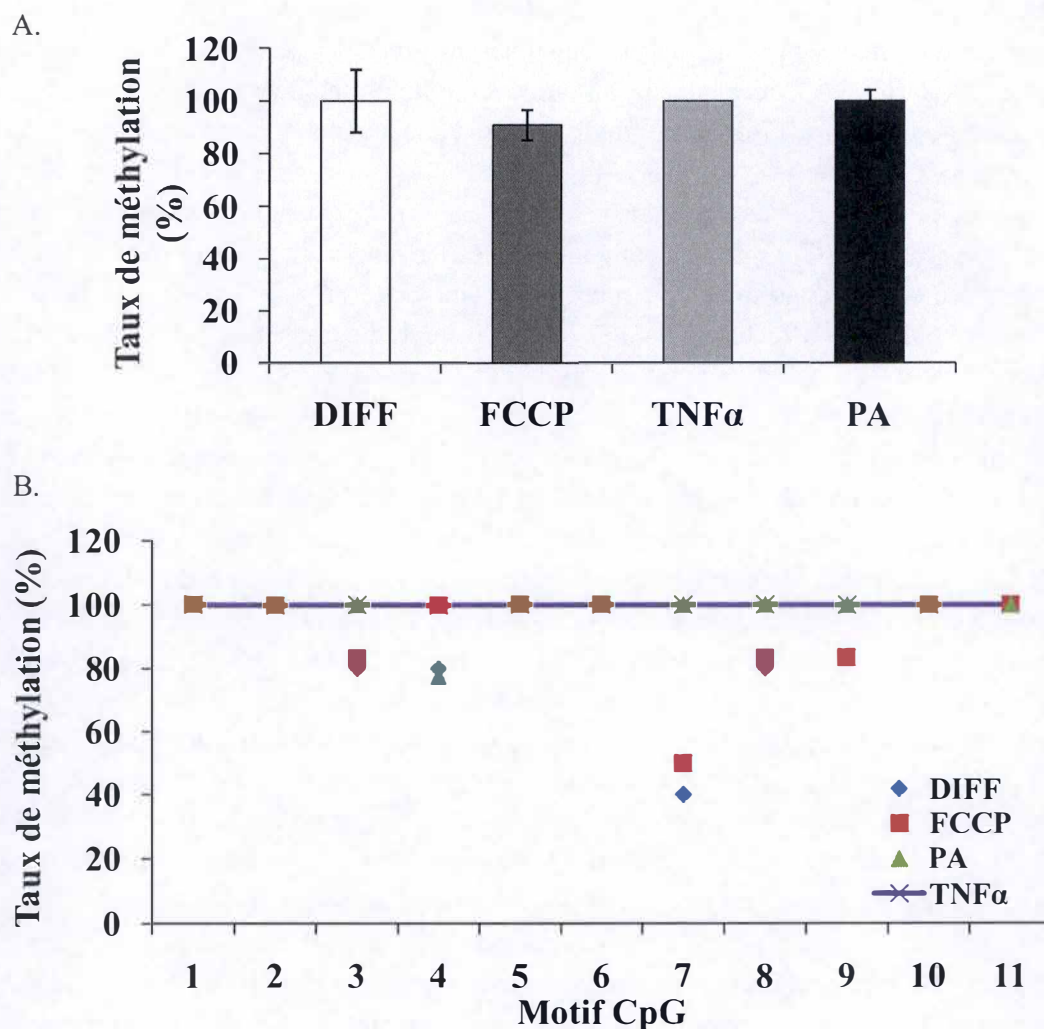


Figure 8 : Effet de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes et d'une incubation des adipocytes en présence de FCCCP ou de TNF α sur le taux global et le statut de méthylation de l'îlot CpG en aval du site de liaison de PPAR γ dans la région distale du promoteur du gène codant pour la leptine (*Lep*).

Les adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés ou non (PA) pendant 12 jours et incubés pendant 72 h en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M FCCCP (FCCCP) ou de 10 ng/ml TNF α (TNF α). L'ADN génomique a ensuite été extrait et le taux de méthylation de la séquence entourant le site de liaison de PPAR γ du promoteur du gène *Lep* a été déterminé par séquençage clonal au bisulfite en suivant le protocole décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». **A.** Le graphique montre les résultats quantitatifs exprimés en pourcentage moyen de méthylation de l'ADN de l'îlot CpG à proximité du site de liaison de PPAR γ pour chaque condition testée. Les résultats représentent la moyenne \pm écart type. **B.** Les mêmes données sont exprimées en pourcentage de méthylation pour chacun des 11 motifs CpG analysés. (100 % : signifie que tous les clones analysés sont méthylés au motif CpG considéré). Le nombre de clones analysés : n = 5 clones pour « DIFF », 6 pour « FCCCP », 2 pour « TNF α » et 9 clones pour la condition « PA ».

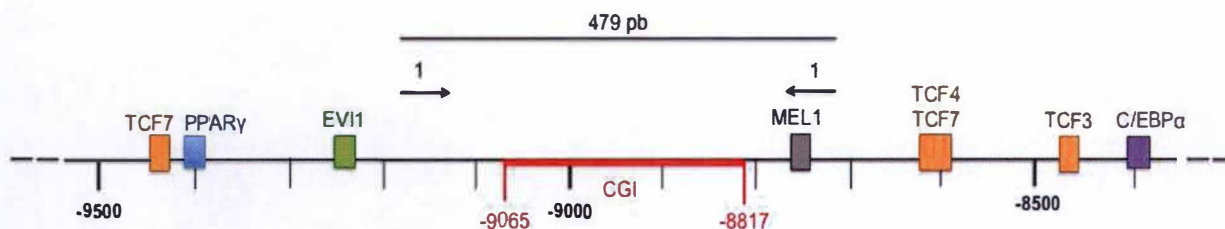
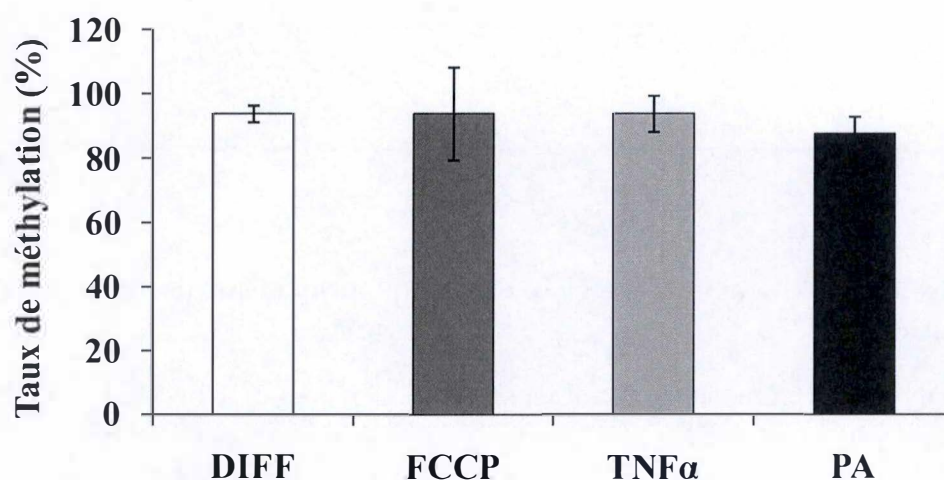


Figure 9 : Organisation de la région distale du promoteur du gène codant pour l'angiotensinogène.

La région distale du promoteur contient un site de liaison pour TCF7 (-9420 à -9436), un site de liaison pour PPAR γ (-9391 à -9413), EVI1 (-9238 à -9254) et le CGI (-9065 à -8817). En aval du CGI sont localisés un site de liaison pour MEL1 (-8743 à -8759), un fragment reconnu par TCF4 et TCF7 (-8621 à -8591), un site de liaison pour TCF3 (-8461 à -8477) et un site de liaison pour C/EBP α (-8394 à -8408). Les flèches représentent la localisation du couple de primers utilisé pour l'amplification de la PCR nichée.

TCF : *T-cell specific HMG-box transcription factor 7* ; PPAR γ : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma* ; C/EBP α : *CCAAT/Enhancer binding Protein* ; EVI1 : *Ectopic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain* ; MEL1 : *MEL1 (MDS/EVI1-like gene 1) DNA-binding protein domain 2* ; CGI : *CpG island*.

A.



B.

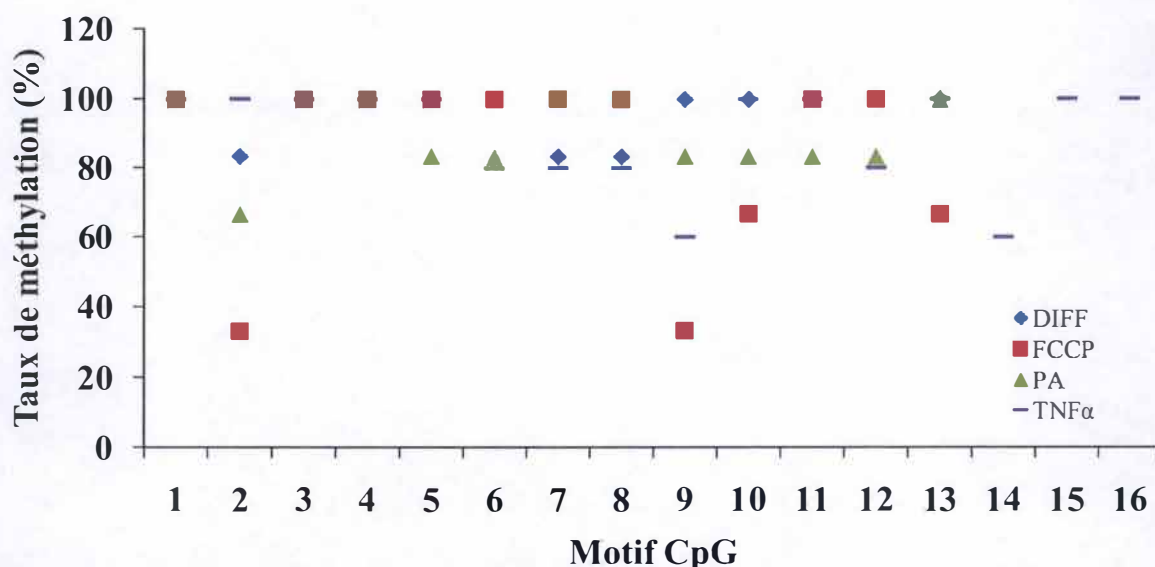


Figure 10 : Effet de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes et d'une incubation des adipocytes en présence de FCCP ou de TNF α sur le taux global et le statut de méthylation de l'îlot CpG dans la région distale du promoteur du gène codant pour l'angiotensinogène (*Agf*).

Les adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés ou non (PA) pendant 12 jours et traités ou non (DIFF) durant 72 h avec 0.5 μ M FCCP (FCCP) ou 10 ng/ml TNF α (TNF α). Après 3 jours de traitement, l'ADN génomique a été extrait et le niveau de méthylation du promoteur du gène *Lep* a été déterminé par séquençage clonal au bisulfite suivant le protocole décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». **A.** Le graphique représente le pourcentage moyen de méthylation de l'ADN (axe y) de l'îlot CpG pour chaque condition testée (axe x). **B.** Les mêmes données sont représentées en probabilité de méthylation de chaque motif CpG analysé (100 % : signifie que tous les clones analysés sont méthylés au motif CpG considéré). 6 clones pour la condition « DIFF », 3 clones pour la condition « FCCP », 5 clones pour la condition « TNF α » et 6 clones pour la condition « PA ».

100 % (**Figure 8A**). Par conséquent, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différentes conditions. Ce résultat suggère que la méthylation globale de l'îlot CpG de la région distale n'influence pas l'expression de la leptine. A notre connaissance, la méthylation de cette région dans les adipocytes 3T3-L1 n'a jamais été analysée en détail dans la littérature.

Cependant, en examinant les différents motifs CpG de manière plus qualitative entre les différentes conditions, nous observons que seul le motif CpG n°4 est hyperméthylé en réponse au découplage mitochondrial ou au TNF α (**Figure 8B**). A l'inverse, seul le motif CpG n°9 semble légèrement hypométhylé dans les adipocytes incubés en réponse au FCCP. L'effet éventuel de la déméthylation d'un unique site CpG dans un îlot CpG hautement méthylé sur la régulation transcriptionnelle n'est donc peut-être pas complètement à exclure. En effet, en utilisant des cellules mononucléaires sanguines périphériques, une étude a comparé le profil de méthylation de 2 régions riches en CpG dans le promoteur du gène codant pour l'IL-6 entre des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et des individus sains. Ils ont pu observer que la déméthylation d'un unique site CpG (-1099 par rapport au site d'initiation de la transcription) est corrélée au niveau d'expression de l'IL-6 suggérant que le statut de méthylation d'un unique CpG peut affecter la régulation transcriptionnelle (Nile et al., 2008).

4.5.3 Îlot CpG de la région distale du promoteur de l'Agt

En utilisant l'algorithme « Methprimer », un seul îlot CpG a pu être identifié au niveau du promoteur de l'angiotensinogène (**Figure 9**). Cependant, les taux de méthylation des CpG de ce fragment de promoteur sont très comparables pour les pré-adipocytes, les adipocytes et les adipocytes incubés en présence de TNF α ou de FCCP (**Figure 10A**). Les pré-adipocytes ont cependant un taux de méthylation légèrement plus faible par rapport aux autres conditions (**Figure 10 A**).

Parmi les 16 motifs CpG analysés individuellement dans les adipocytes par rapport aux pré-adipocytes : 3 sites sont hypométhylés (CpG 7, CpG 8, CpG 14), 4 sites ont un niveau de méthylation inchangé (CpG 1, CpG 3, CpG 4, CpG 13) et 7 sites sont hyperméthylés (CpG 2, CpG 5, CpG 6, CpG 9, CpG 10, CpG 11, CpG 12) sont hyperméthylés (**Figure 10 B**).

Wang et ses collaborateurs ont récemment étudié l'effet de la méthylation du promoteur de l'angiotensinogène chez l'humain et révèlent que les tissus présentant une hypométhylation du site de C/EBP α est associée avec une expression élevée de l'angiotensinogène. De plus, en stimulant des cellules de la glande adrénocorticale humaine en culture avec de l'IL-6, les auteurs ont pu associer une hypométhylation à proximité du site de liaison de C/EBP α et du site d'initiation de la transcription à une forte expression de l'angiotensinogène (Wang et al., 2014). De plus, une hypométhylation localisée autour des sites de liaison de C/EBP α a également été observée dans le tissu adipeux viscéral humain et de rat en réponse à un excès d'aldostérone circulant et à l'absorption de sel, respectivement. Ainsi, les auteurs suggèrent que la liaison de C/EBP α induit d'abord une augmentation de l'accessibilité de la chromatine suivie d'une déméthylation de l'ADN à proximité du site de liaison du facteur de transcription et du site d'initiation de la transcription du promoteur de l'angiotensinogène résultant en une augmentation de l'expression de l'adipokine (Wang et al., 2014).

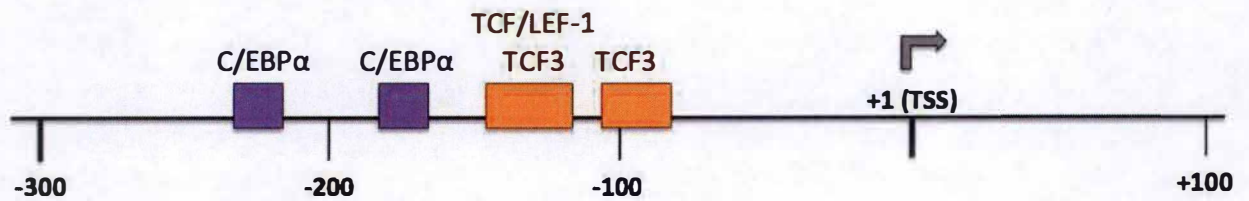


Figure 11 : Organisation du promoteur proximal du gène codant pour l'angiotensinogène (*Agt*).

Le promoteur proximal de l'*Agt* contient deux sites de liaison pour C/EBPα (-216 à -272 et -161 à -175), le facteur de transcription TCF possède également un site de liaison commun (-123 à -143) et le facteur de transcription TCF3 possède également un site de liaison (-89 à -105).

C/EBPα : CCAAT/Enhancer binding Protein, TCF : T-cell specific HMG-box transcription factor .

Dans la région distale du promoteur de l'angiotensinogène, le site de liaison de C/EBP α est localisé à plus de 400 pb de l'îlot CpG et, dans nos conditions expérimentales, nous n'observons pas de différence du niveau de la méthylation de l'ADN entre des adipocytes contrôles et des adipocytes incubés en présence de FCCP ou TNF α . En regard des résultats très récents de Wang et ses collaborateurs, nous avons décidé d'analyser la présence des sites de liaison de facteurs de transcription avec l'algorithme « Genomatix Matinspector » dans la région proximale du promoteur et nous trouvons 2 sites de liaison à C/EBP α (Figure 11).

4.6 Silencage des DNMTs

4.6.1 Optimisation de la concentration en siRNA dirigés contre DNMT1 et DNMT3a

Comme discuté au cours de l'introduction, le degré de méthylation de l'ADN est modulé par 2 classes d'enzymes : les DNMTs et les TETs. Sachant que le niveau d'expression de 4 adipokines (leptine, adiponectine, résistine et angiotensinogène) est significativement réduit et que l'activité globale des DNMTs est augmentée dans les adipocytes en réponse au découplage mitochondrial induit par le FCCP, il est intéressant d'analyser l'effet du *silencage* de l'expression des DNMTs sur le niveau d'expression de ces adipokines. En effet, si la sous-expression de la leptine dans les adipocytes traités au FCCP pouvait être limitée (même partiellement) suite au silencage des DNMTs, nous pourrions valider l'hypothèse que la diminution de l'expression des adipokines observée en réponse au FCCP est associée à l'augmentation de la méthylation de l'ADN du promoteur de la leptine. Nous avons également décidé d'intégrer dans cette analyse, l'adiponectine, la résistine et l'angiotensinogène bien que des changements de méthylation (angiotensinogène) ou la présence d'îlot CpG (adiponectine) n'ont pu être observés au niveau de leur promoteur. De plus, la recherche de l'effet du silencage de chaque DNMT sur le profil de méthylation des fragments de promoteur étudiés devrait nous permettre d'identifier la/les DNMT(s) potentiellement impliquée(s) dans la modification du pattern de méthylation de l'ADN du promoteur de la leptine dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial.

Avant d'investiguer les effets phénotypiques du *silencage* des DNMTs sur le pattern de méthylation et l'expression des adipokines d'intérêt, une optimisation de la concentration en siRNA introduits dans les cellules par électroporation est requise. Pour la recherche de l'effet sur cible des siRNAs dirigés contre DNMT1, DNMT3a ou DNMT3b, différentes concentrations (20, 50 et 100 nM) en siRNA ont été testées. L'efficacité du *silencage* a été évaluée en déterminant l'abondance relative du transcrit de chacune des DNMTs. Comme contrôles, des cellules ont également été électroporées avec les concentrations correspondantes en siRNA NTP (*Non Targeting Pool*). Un deuxième contrôle est constitué de cellules électroporées en absence de siRNAs, permettant de mettre en évidence d'éventuels effets des siRNAs NTP (Figure 12).

Nous observons que les siRNAs spécifiquement dirigés contre la DNMT1 provoquent une forte diminution de l'abondance du transcrit de DNMT1 (Figure 12A). En effet, le niveau d'expression du gène DNMT1 n'atteint que 10 % de la valeur obtenue pour des adipocytes électroporés en absence de siRNAs. Notons encore que le siRNA NTP a également un effet

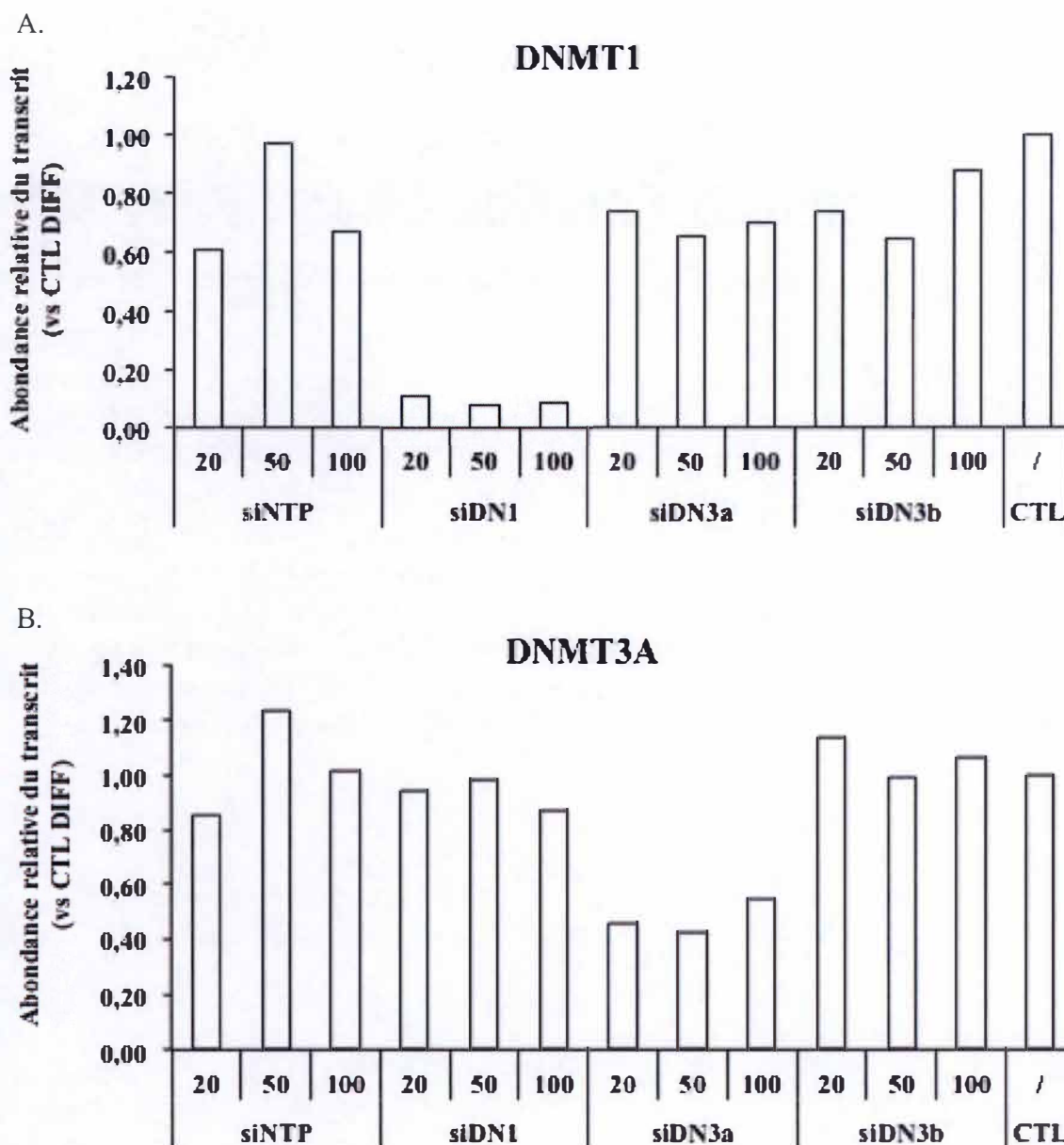


Figure 12 : Optimisation de la concentration en siRNA pour le silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de différentes concentrations de siRNAs (20, 50 et 100 nM). Le contrôle représente des cellules électroporées en présence de siRNAs contrôles NTP. Après électroporation, les cellules ont été traitées comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, une extraction d'ARNm a été effectuée en vue d'analyser l'abondance du transcrit par RT-qPCR. Les résultats représentent l'abondance relative du transcrit de la DNMT1 (A.) et de la DNMT3a (B.) par rapport à la condition contrôle (CTL), c'est-à-dire des cellules électroporées en absence de siRNAs.

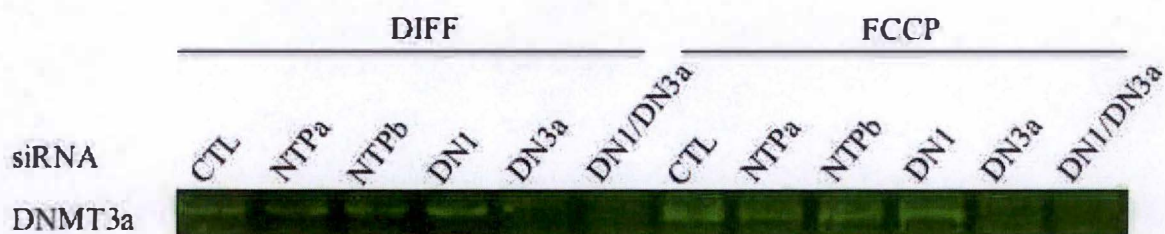


Figure 13 : Abondance protéique de la DNMT3a dans les conditions de « silençage » des DNMTs.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de 3,1 μ l de siRNAs (20 nM), dirigés contre la DNMT1 (DN1), la DNMT3a (DN3a) ou en combinaison contre la DNMT1 et la DNMT3a simultanément (DN1/DN3A). Le contrôle représente des cellules électroporées en absence (CTL) ou en présence de siRNAs contrôles NTP soit avec un volume de 3,1 μ l de siRNAs NTP (NTPa), soit avec un volume de 6,2 μ l de siRNAs NTP (NTPb). Après électroporation, les cellules ont été traitées en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M de FCCP (FCCP) comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, une extraction de protéines nucléaires et une resuspension finale dans du tampon DLA ont été effectuées en vue d'analyser l'abondance protéique de la DNMT3a par western blot en fluorescence.

non négligeable (40 % pour des concentrations de 20 et 100 nM en siRNA NTP) sur le niveau d'expression de DNMT1. De plus, le silençage de la DNMT1 médié par le siRNA anti-DNMT1 ne semble pas affecter l'abondance du transcrit de la DNMT3a (**Figure 12B**) et de la DNMT3b (donnée non montrée). Pour la suite des expériences, nous avons choisi la concentration de 20 nM en siRNA dirigé contre DNMT1, une concentration également utilisée dans la littérature (Londono Gentile et al., 2013).

Concernant le silençage de DNMT3a, son efficacité est inférieure au silençage de la DNMT1 puisque nous n'obtenons pas plus de 60 % de diminution de l'abondance du transcrit de la DNMT3a dans ces conditions (**Figure 12B**). Néanmoins, nous postulons que le silençage de la DNMT3a pourrait être assez efficace pour induire une diminution de l'expression et de l'activité de la DNMT3a. En accord avec les résultats du silençage de la DNMT1, l'inhibition de l'expression de la DNMT3a ne semble pas avoir d'effet sur l'abondance des transcrits des autres DNMTs. Nous utiliserons également la concentration 20 nM pour le siRNA dirigé contre la DNMT3a. Nous n'avons jamais pu trouver des conditions permettant de diminuer l'expression de la DNMT3b, son niveau d'expression étant très faible dans les adipocytes 3T3-L1.

Cette recherche de l'efficacité de l'inhibition de l'expression de deux DNMTs, va maintenant nous permettre de tester l'effet du silençage, même incomplet, de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'abondance protéique des enzymes (pour vérifier l'impact au niveau protéique), sur l'expression des adipokines différenciellement exprimées en réponse au FCCP, et sur le taux de méthylation du promoteur de la leptine.

4.6.2 Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'abondance protéique de DNMT1 et DNMT3a

Comme nous ne sommes jamais parvenus à détecter DNMT1 dans les adipocytes avec une bande à un poids moléculaire attendu, nous n'avons pas testé l'effet du silençage en présence de siRNAs dirigés contre DNMT1. Dans le but d'évaluer l'effet et l'efficacité du silençage de la DNMT3a sur l'abondance protéique, des adipocytes 3T3-L1 ont été électroporés en présence ou en absence de siRNAs dirigés contre DNMT3a puis incubés pendant 72 h en présence ou en absence de FCCP. L'abondance des DNMTs dans les extraits nucléaires a ensuite été déterminée par western blot (**Figure 13**). Nous observons que le siRNA dirigé contre le transcrit DNMT3a est capable de diminuer l'abondance de l'enzyme alors qu'un siRNA dirigé contre la DNMT1 ne modifie pas son abondance. La combinaison des deux siRNAs diminue également l'abondance de la DNMT3a (**Figure 13**).

4.6.3 Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'expression des adipokines (leptine, adiponectine, angiotensinogène et résistine) par des adipocytes incubés en présence de FCCP

Afin de tester l'effet éventuel de la diminution de l'expression des DNMTs induit par le silençage sur le niveau d'expression de la leptine, de l'adiponectine, de l'angiotensinogène et de la résistine dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial, les abondances relatives des transcrits de ces adipokines dans des adipocytes électroporés en présence de siRNAs dirigés contre la DNMT1 ou la DNMT3a ont été analysées (**Figures 14 et 15**).

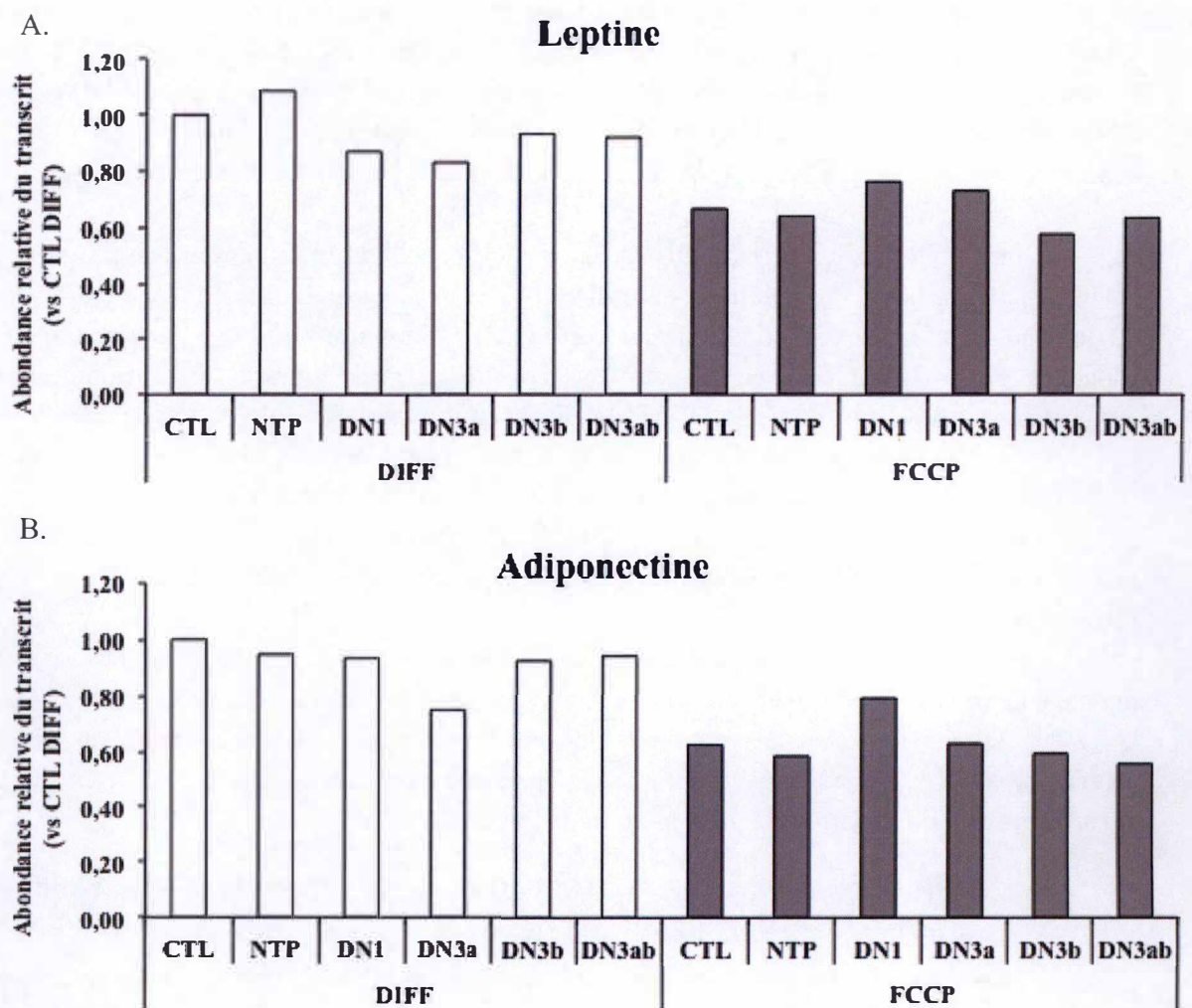


Figure 14 : Effet du silençage des DNMTs sur l'expression de la leptine et de l'adiponectine.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de siRNAs à une concentration de 20 nM puis incubés en présence (FCCP) ou en absence (DIFF) de 0,5 μ M de FCCP pendant 72 h. Le contrôle représente des cellules électroporées en présence de siRNAs contrôles NTP. Après électroporation, les cellules ont été traitées comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, une extraction d'ARNm a été effectuée en vue d'analyser l'abondance relative du transcrit par RT-qPCR. Les résultats représentent l'abondance relative du transcrit de la leptine (A.) et de l'adiponectine (B.) par rapport à la condition contrôle (CTL), c'est-à-dire des cellules électroporées en absence de siRNAs.

Concernant la leptine, nous observons que le silençage des DNMTs conduit à une faible diminution de l'expression (ne dépassant pas 20 % de réduction de l'abondance du transcrit) de l'adipokine dans les adipocytes par rapport au niveau d'expression de la leptine dans les adipocytes électroporés en absence ou en présence de siRNAs (contrôles). En comparant le niveau d'expression de la leptine dans les adipocytes électroporés en présence de siRNAs dirigés contre la DNMT1 puis incubés en présence de FCCP, on peut observer que la diminution de l'expression de la leptine induite par le découplage mitochondrial est légèrement plus faible (d'environ 10 %) par rapport aux adipocytes électroporés en présence ou en absence de siRNAs NTP. Des effets comparables sont observés en présence de siRNAs dirigés contre la DNMT3a alors que le silençage de la DNMT3b ne semble pas modifier l'expression de la leptine par rapport aux adipocytes électroporés en absence ou en présence de siRNAs NTP (**Figure 14A**). Cependant, nous ne disposons que d'un seul réplicat pour ces analyses et il est donc impossible de conclure à un éventuel effet du silençage des DNMTs sur le niveau d'expression de cette adipokine. De plus, le niveau d'expression de la leptine dans les adipocytes incubés en présence de FCCP après avoir été électroporés en absence ou en présence de siRNAs contrôles (NTP) est bien supérieur au très faible niveau d'expression observé lors de l'analyse du profil d'expression de la leptine par des adipocytes non électroporés incubés en présence de FCCP (**Figure 1**).

Concernant l'adiponectine, les différents silençages de DNMTs testés dans les adipocytes contrôles ne semblent pas affecter le niveau d'expression de l'adiponectine, excepté le silençage de la DNMT3a qui cause une diminution de l'abondance du transcrit de l'adipokine de plus de 20 % dans les adipocytes (**Figure 14B**). Tout comme pour la leptine, l'effet du découplage mitochondrial dans les adipocytes 3T3-L1 électroporés en absence ou en présence de siRNAs contrôles sur la diminution de l'expression de l'adiponectine n'est pas aussi sévère que celui observé pour des adipocytes non électroporés exposés au FCCP. En effet, la diminution d'expression de l'adipokine observée pour des adipocytes électroporés puis incubés en présence de FCCP est seulement de 40 % (contre environ 90 % pour des adipocytes non électroporés et exposés à la molécule de découplage) (**Figure 1**). A nouveau, cette donnée suggère un effet secondaire de l'électroporation. Toutefois, on peut remarquer que, dans ces conditions, le silençage de la DNMT1 dans les adipocytes avant l'exposition au FCCP limite partiellement (17 %) la diminution d'expression de l'adiponectine dans les adipocytes en réponse au découplage mitochondrial. Cet effet, n'est pas observé pour des siRNAs dirigés contre la DNMT3a. Ainsi, comme pour le résultat obtenu pour la leptine et malgré toutes les précautions à prendre sur l'interprétation des résultats, il semble que le silençage de la DNMT1 pourrait légèrement diminuer l'effet répresseur induit par le découplage mitochondrial sur l'abondance relative du transcrit de l'adiponectine.

Concernant l'angiotensinogène, le silençage des DNMTs dans les adipocytes 3T3-L1 ne semble pas induire de modifications du niveau d'expression de l'angiotensinogène, excepté dans les adipocytes présentant une diminution de l'expression de DNMT1 pour lesquels on observe une réduction de 20 % de l'expression de l'adipokine par rapport au niveau d'expression dans les adipocytes électroporés en présence ou en absence de siRNAs contrôles (**Figure 15A**). En réponse au découplage mitochondrial, les adipocytes électroporés expriment encore l'angiotensinogène à un niveau représentant 80 % du niveau d'expression mesuré dans des adipocytes électroporés avec ou sans siRNAs NTP (**Figure 15A**). De

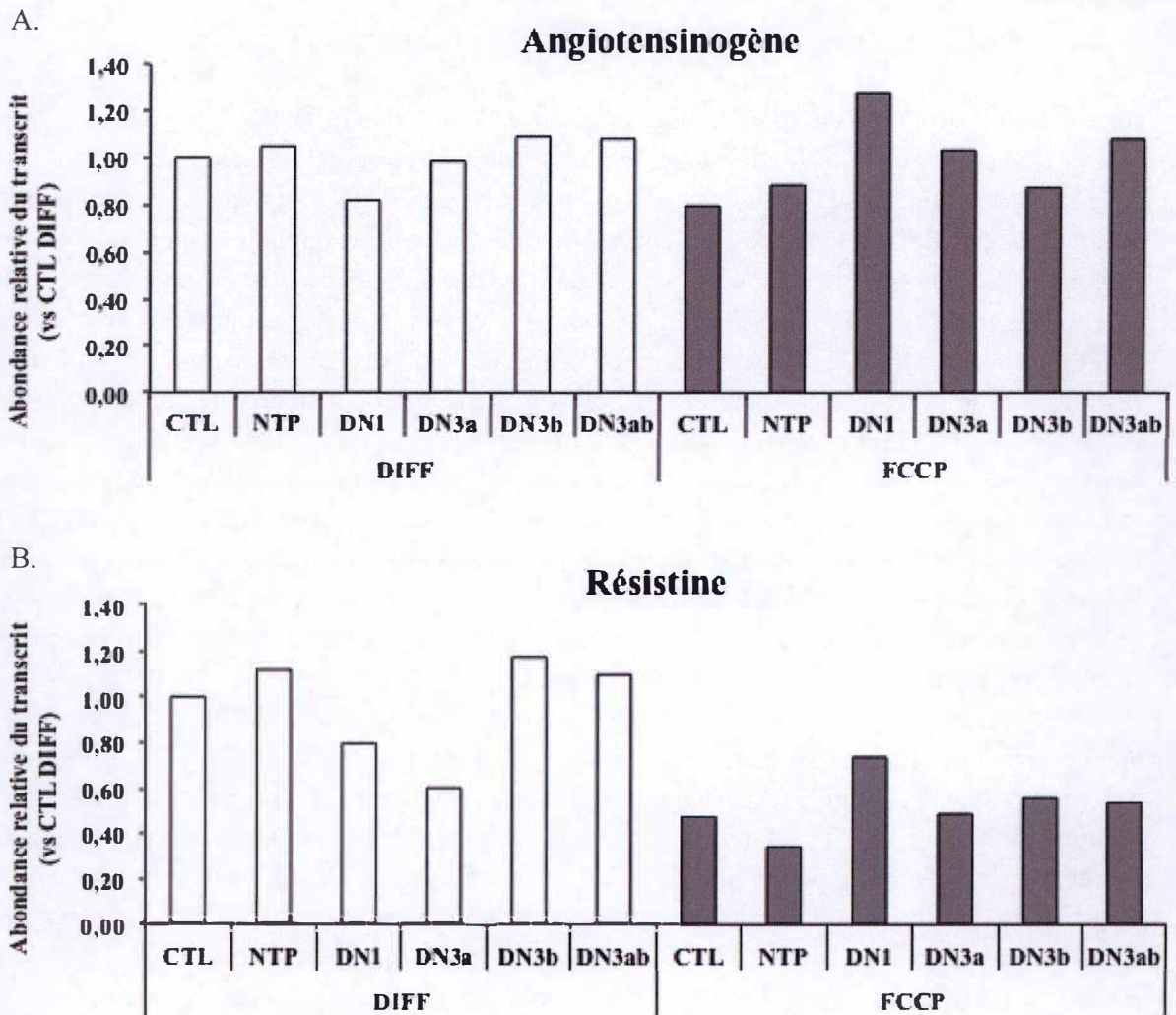


Figure 15 : Effet du silençage des DNMTs sur l'expression de l'angiotensinogène et de la résistine.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de siRNAs à une concentration de 20 nM puis incubés en présence (FCCP) ou en absence (DIFF) de 0,5 μ M FCCP durant 72 h. Le contrôle représente des cellules électroporées en présence de siRNAs contrôles NTP. Après électroporation, les cellules ont été traitées comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, une extraction d'ARNm a été effectuée en vue d'analyser l'abondance relative du transcrit par RT-qPCR. Les résultats représentent l'abondance relative du transcrit de l'angiotensinogène (A.) et de la résistine (B.) par rapport à la condition contrôle (CTL), c'est-à-dire des cellules électroporées en l'absence de siRNAs.

nouveau, l'effet répresseur du découplage sur l'expression de cette adipokine est beaucoup plus faible que celui obtenu lors de l'analyse de l'abondance du transcrit pour des adipocytes non électroporés et incubés en présence de FCCP (**Figure 1**). Cependant, alors que le silençage de la DNMT1 dans les adipocytes tend à diminuer l'expression de l'angiotensinogène, l'inhibition de l'expression de la DNMT1 dans les adipocytes exposés au FCCP non seulement prévient la diminution d'expression induite par le découplage mitochondrial mais aussi entraîne une augmentation de l'expression de plus de 30 % par rapport aux conditions contrôles. Bien qu'il faille rester très prudent, ce résultat suggère que la DNMT1 pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de cette adipokine en réponse au découplage mitochondrial.

Nous avons également analysé l'expression de la résistine qui présente un îlot CpG au niveau de son promoteur mais dont les conditions PCR pour l'amplification de la région de l'îlot CpG n'ont pu être optimisées. Dans les adipocytes non traités, l'expression de la résistine semble peu affectée par l'introduction de siRNAs dans la cellule. En revanche, le silençage de la DNMT1, mais plus encore de la DNMT3a semblent affecter l'expression de la résistine dans les adipocytes ce qui peut indiquer un rôle de cette enzyme dans la régulation de l'expression de la résistine dans les adipocytes contrôles. Tout comme pour le profil d'expression des 3 adipokines précédentes, l'effet du FCCP sur le niveau d'expression de l'adipokine par des adipocytes électroporés en présence ou en absence de siRNAs n'est pas aussi marqué (environ 60 % de diminution de l'expression) (**Figure 15B**) que pour des adipocytes non électroporés exposés au FCCP pendant 3 j (**Figure 1**). Cependant, encore une fois, dans les adipocytes incubés en présence de FCCP, le silençage de la DNMT1 semble également limiter la diminution d'expression de la résistine induite par le FCCP puisque dans ces conditions, la diminution de l'abondance du transcrit n'est plus que de 25 % par rapport à la condition contrôle (adipocytes uniquement électroporés). Cet effet n'est pas observé dans des adipocytes électroporés avec des siRNAs ciblant les autres DNMTs (DNMT3a et 3b) (**Figure 15B**).

De manière très étonnante, la conclusion essentielle de ce set d'expériences serait que le silençage de la DNMT1 dans des adipocytes incubés en présence de FCCP semble induire une diminution de l'effet inhibiteur du découplage mitochondrial sur l'expression de ces 4 adipokines alors que la DNMT1 est essentiellement connue pour réguler la méthylation de maintenance qui a lieu lors de la division cellulaire. Or, il est connu que l'activité mitotique des adipocytes 3T3-L1 s'arrête au jour 2 de la différenciation et qu'aucun effet du FCCP sur une éventuelle reprise de la division cellulaire des adipocytes n'a été mis en évidence par le laboratoire d'accueil (données non montrées). Néanmoins, il a déjà été montré que la DNMT1 pourrait être active sur des substrats d'ADN non méthylés et être impliquée dans la méthylation *de novo* (Feltus et al., 2002). Nos données supportent donc une éventuelle participation de la DNMT1 dans la diminution d'expression de ces 4 adipokines observée dans des adipocytes exposés à un découplage mitochondrial. Il faut cependant nuancer cette interprétation car ces résultats révèlent aussi que l'électroporation, en elle-même, pourrait interférer et modifier le niveau d'expression des adipokines dans les adipocytes incubés en présence de FCCP suggérant un effet non spécifique et difficile à contrôler de l'électroporation sur l'expression des adipokines. Cette observation rend l'interprétation des résultats difficile, voir impossible. Il est à ce stade plus prudent d'attendre des données

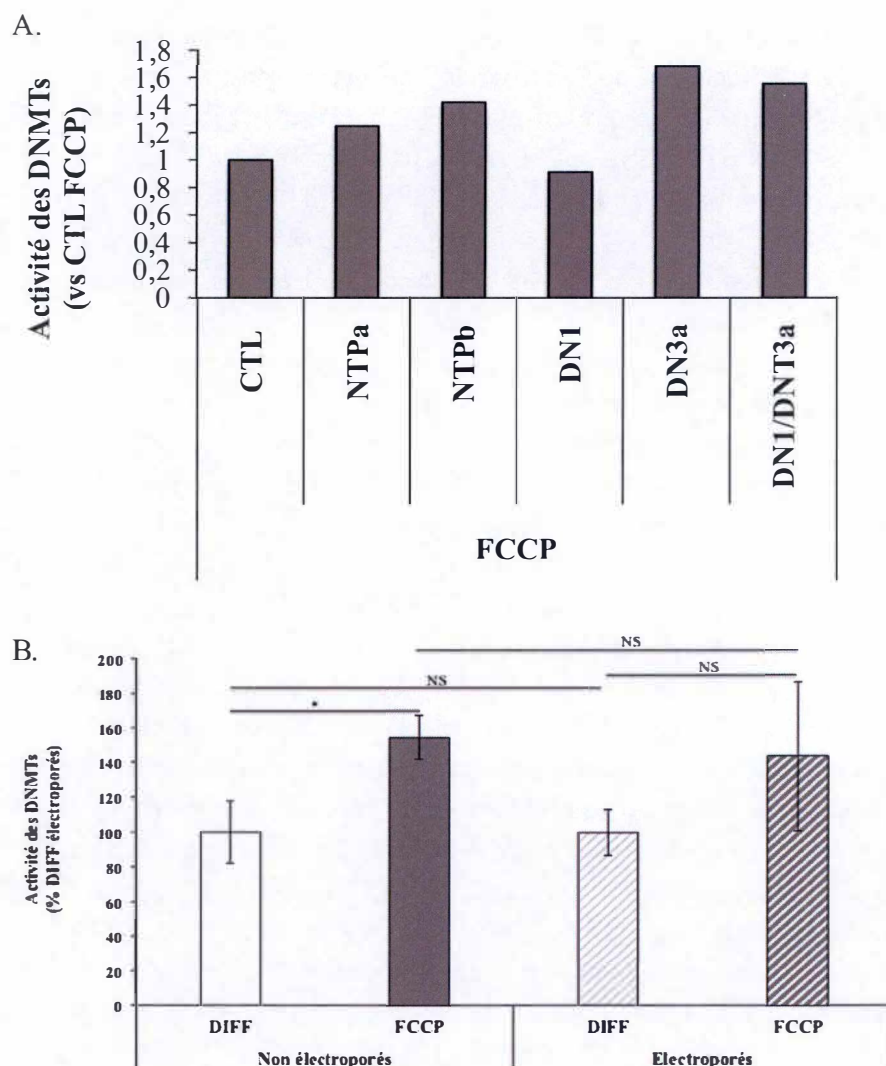


Figure 16 : Effet du silençage des DNMTs ou de l'électroporation sur l'activité des DNMTs dans les adipocytes incubés ou non en présence de FCCP.

A. Après 12 jours de différenciation, des adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de 3,1 μ l de siRNAs à une concentration de 20 nM, dirigés soit contre la DNMT1 (DN1), soit contre la DNMT3a (DN3a) soit ajouté en combinaison contre la DNMT1 et la DNMT3a (DN1/DN3a). Le contrôle représente des cellules électroporées en absence (CTL) ou en présence de siRNAs contrôles NTP soit avec un volume de 3,1 μ l de siRNAs NTP (NTPa), soit avec un volume de 6,2 μ l de siRNAs NTP (NTPb). Après électroporation, les cellules ont été incubées en présence de 0,5 μ M de FCCP (FCCP) comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, une extraction de protéines nucléaires et une resuspension finale dans du tampon SA ont été effectuées en vue d'analyser l'activité enzymatique des DNMTs. **B.** Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 3 jours en absence (DIFF) ou en présence (FCCP) de 0,5 μ M de FCCP ont été électroporés en absence de siRNAs (hachuré). Des extraits de protéines nucléaires ont ensuite été préparés en vue d'analyser l'activité enzymatique des DNMTs (voir Matériel et Méthodes). * $P < 0,05$; significativement différent comme déterminé par le test statistique T de Student ($n = 3$).

supplémentaires pour déterminer si les effets obtenus sont bien réels ou font partie d'un « bruit de fond » lié à la variabilité expérimentale.

4.6.4 Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur l'activité enzymatique des DNMTs dans des adipocytes incubés en présence de FCCP

Bien que nous avons montré que le silençage de la DNMT3a est efficace se traduisant par une diminution de l'abondance du transcrit ayant un impact sur la diminution de l'abondance de la protéine (**Figure 13**), il est également nécessaire de vérifier que le silençage individuel des DNMTs se traduit par une baisse de l'activité enzymatique. De plus, le silençage individuel de chacune des DNMTs nous permettrait de déterminer si l'augmentation de l'activité des DNMTs en réponse au découplage mitochondrial implique une augmentation de l'activité de la DNMT1, de la DNMT3a ou des 2 DNMTs. Des adipocytes ont donc été électroporés en présence ou en absence de siRNAs dirigés contre les DNMTs puis incubés en présence de FCCP (0,5 μ M) pendant une période de 72 h. L'activité des DNMTs a ensuite été dosée au moyen du kit *DNMT Activity/Inhibition Assay* (Active Motif) comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » (**Figure 16A**).

L'activité DNMTs a donc ensuite été dosée dans des adipocytes électroporés en présence ou en absence de siRNAs contrôles ou en présence de siRNAs dirigés contre les DNMTs avant d'être incubés en présence de 0,5 μ M en FCCP pendant 3 jours. A part un léger effet du siRNA dirigé contre la DNMT1 (environ 30 % de diminution mais non observé lorsque les cellules sont électroporées en présence de siRNAs dirigés contre la DNMT1 et DNMT3a) (**Figure 16A**), le silençage des DNMTs n'a que peu ou pas d'effet sur l'activité DNMTs. Ce résultat pourrait s'expliquer de plusieurs manières : 1) la faible diminution d'expression des enzymes DNMTs obtenue en réponse aux siRNAs est insuffisante pour voir un effet sur l'activité globale des DNMTs, 2) d'autres enzymes DNMTs contribuent à l'activité globale mesurée ou 3) mise en place d'un système de compensation par les DNMTs non ciblées ou encore 4) l'électroporation diminue déjà très fortement l'activité DNMTs dans les cellules. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons comparé l'activité des DNMTs dans des adipocytes électroporés ou non, puis incubés en présence ou en absence de 0,5 μ M FCCP (**Figure 16B**). Dans cette expérience, nous avons été surpris de constater que l'électroporation semble avoir peu d'effet sur l'activité des DNMTs dans les adipocytes, que ces cellules aient été incubées en absence ou en présence de FCCP. Sur base de ce résultat, il est impossible d'interpréter l'effet du silençage sur l'activité des DNMTs que ce soit dans des adipocytes ou dans les cellules incubées en présence de FCCP. La seule conclusion que nous pouvons tirer est que les siRNAs utilisés contre la DNMT1 ou la DNMT3a affectent peu ou pas l'activité globale des DNMTs.

4.6.5 Effet du silençage de la DNMT1 et de la DNMT3a sur la méthylation de l'ADN par des adipocytes incubés en présence de FCCP

Même si les résultats des effets du silençage des DNMTs sur l'activité globale des DNMTs sont peu encourageants, nous avons montré, du moins pour la DNMT3a, que le siRNA était efficace sur la cible puisque l'abondance de la protéine diminue (**Figure 13**). De plus, l'effet du siRNA dirigé contre la DNMT1 est capable de limiter légèrement la diminution d'expression des adipokines (**Figures 14 et 15**). Nous avons aussi voulu

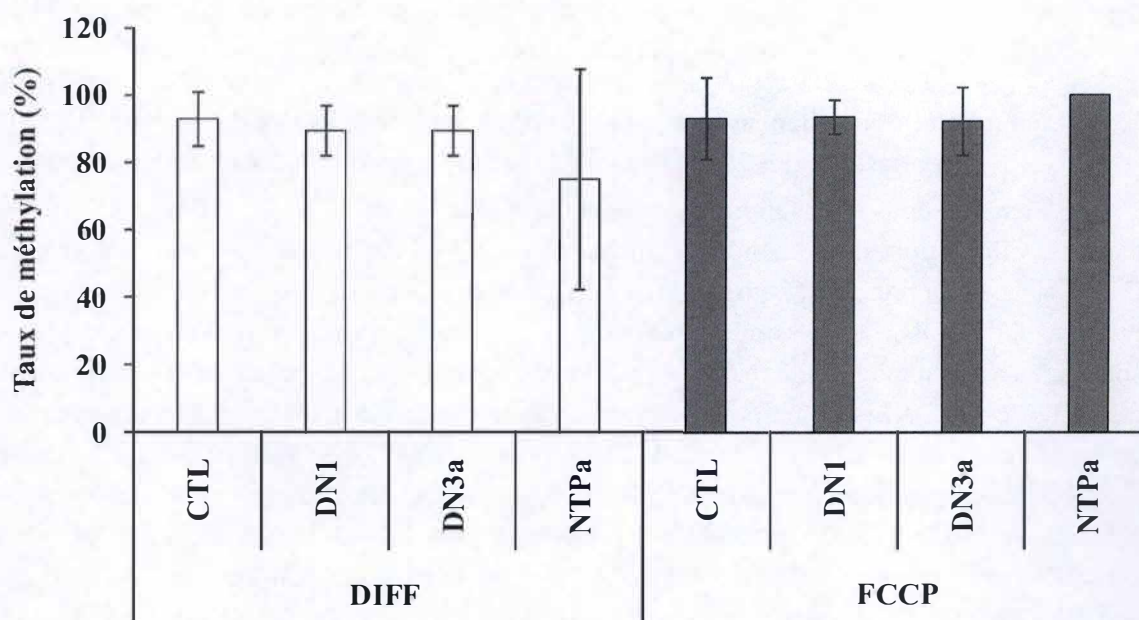


Figure 17 : Effet du silençage des DNMTs sur la méthylation de l'ADN du promoteur proximal du gène *Lep*.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été trypsinisés et transfectés par électroporation en présence de 3,1 μ l de siRNAs à une concentration de 20 nM, dirigés contre la DNMT1 (DN1) ou la DNMT3a (DN3a). Le contrôle représente des cellules électroporées en absence (CTL) ou en présence de siRNAs contrôles NTP soit avec un volume de 3,1 μ l de siRNAs NTP (NTPa). Après électroporation, les cellules ont été traitées en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μ M de FCCP (FCCP) comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Après 3 jours de traitement, l'ADNg a été extrait et le niveau de méthylation de l'îlot CpG localisé dans le promoteur proximal de la leptine a été déterminé par séquençage clonal au bisulfite suivant le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes.

caractériser l'effet du silençage des DNMTs sur le niveau de la méthylation de l'ADN du promoteur de la leptine. Nous avons donc déterminé le taux de la méthylation de l'ADN du promoteur de la leptine par clonage et séquençage au bisulfite dans des cellules électroporées en présence ou en absence de siRNAs contrôles ou de siRNAs dirigés contre la DNMT1 ou la DNMT3a puis incubées pendant 72 h en présence ou en absence de FCCP (0,5 μ M). Nous savons que le FCCP conduit à une augmentation de la méthylation du promoteur proximal de la leptine, à proximité du site de liaison de C/EBP α (**Figure 7**).

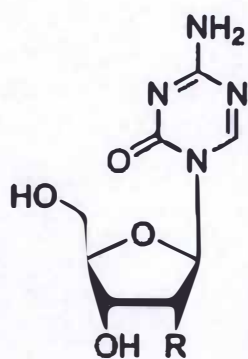
De manière étonnante, nous ne retrouvons plus l'effet du FCCP sur l'augmentation de la méthylation de l'ADN dans des adipocytes électroporés en absence de siRNA puis incubés en présence de FCCP (**Figure 17**). Ce résultat indique probablement un effet interférentiel indésirable de l'électroporation. Dans ces conditions, il est impossible d'analyser les données pour les cellules électroporées en présence des siRNAs dirigés contre les DNMTs. Cette expérience devrait être refaite avec des contrôles pour permettre de comparer si l'hyperméthylation induite par le FCCP ne se produit plus ou si l'hyperméthylation est induite dans les adipocytes contrôles en réponse à l'électroporation. Les premières analyses montrent qu'il s'agirait d'une hyperméthylation observée dans les adipocytes électroporés mais ces données doivent être confirmées.

Nous savons que l'électroporation d'adipocytes 3T3-L1 induit une perte spontanée et importante en TG/TAG dans les adipocytes électroporés (données non montrées). L'électroporation diminue également fortement la différence d'expression des adipokines dans les adipocytes incubés en présence de FCCP par rapport à des adipocytes contrôles, car le niveau d'expression de ces adipokines est déjà diminué dans les adipocytes électroporés (données non montrées). Ces données et effets interférentiels de l'électroporation pourraient résulter de changement dans la méthylation du génome en réponse à l'électroporation. En effet, les différentes conditions de silençage et d'électroporation en présence ou en absence de siRNAs contrôles analysées dans des adipocytes incubés ou non en présence de FCCP révèlent un niveau de méthylation du fragment de promoteur semblable à celui des pré-adipocytes et proche de 100 % (données non montrées). Intégrer des pré-adipocytes dans l'étude du silençage des DNMTs sur la méthylation de l'ADN du promoteur de la leptine nous permettrait éventuellement de comparer ces résultats et d'émettre l'hypothèse que l'électroporation pourrait initier une sorte de « dé-différenciation » spontanée, modifiant la méthylation de l'ADN et rendant difficilement comparables des échantillons provenant d'adipocytes 3T3-L1 électroporés ou non électroporés.

4.7 Effet d'inhibiteurs chimiques de DNMTs sur l'expression des adipokines

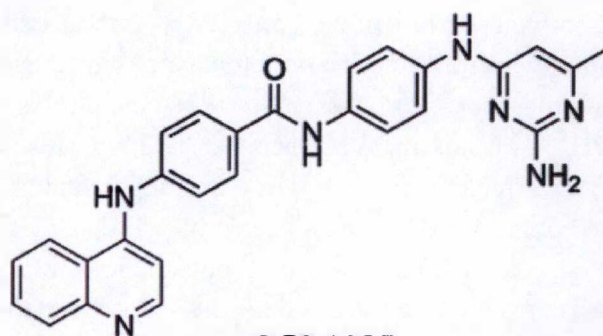
4.7.1 Effet de la 5-azacytidine ou du SGI-1027 sur l'abondance des transcrits

Nous savons que l'électroporation des adipocytes 3T3-L1 modifie la biologie des cellules. En effet, l'électroporation induit une perte de TG/TAG dans les cellules au cours du temps post-électroporation (Silvia Tejerina, communication personnelle). De plus, nos données sur l'étude de l'activité enzymatique des DNMTs et la méthylation de l'ADN dans les cellules électroporées nous permettent de penser que ce traitement a des effets non



5-Azacytidine (R = OH)

5-Aza-2'-deoxycytidine (R = H)



SGI-1027

Figure 18 : Structure des inhibiteurs des DNMTs utilisés.

La 5-azacytidine est un analogue de la cytidine alors que le SGI-1027 est un dérivé quinolone.

spécifiques et non désirés sur la biologie des adipocytes et leur réponse au découplage mitochondrial. De plus, le peu d'effet des siRNAs obtenu sur le silençage de l'expression de la DNMT1 ou de la DNMT3a nous a conduit à une dernière approche expérimentale visant à rechercher l'effet éventuel de l'inhibition chimique des DNMTs sur le niveau d'expression des quatre adipokines étudiées (leptine, adiponectine, angiotensinogène et résistine). Cette approche nous permet d'éviter l'électroporation.

Nous avons donc décidé d'utiliser deux inhibiteurs à large spectre pour inhiber les DNMTs : la 5-azacytidine (5-AZA : un analogue de la cytidine) et le SGI-1027 (un composé de la famille des quinolones) (**Figure 18**). Le choix du 5-AZA peut paraître surprenant en raison de l'absence de division cellulaire dans les adipocytes 3T3-L1 et l'impossibilité de la 5-azacytidine de s'incorporer dans l'ADN. Cependant, cette molécule a également un autre mécanisme d'action puisqu'elle induirait une rapide dégradation de la DNMT1 en la dirigeant vers la voie du protéasome comme montré dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Ghoshal et al., 2005). La 5-azacytidine a déjà été utilisée dans des adipocytes 3T3-L1 (Taler et Jones, 1974; Sager et al., 1982) et il a été montré que le traitement de pré-adipocytes avec la 5-azacytidine induit une accélération de la différenciation en adipocyte (Taylor and Jones, 1979), un résultat comparable au silençage des DNMTs (Londono Gentile et al., 2013). Conscient de la cytotoxicité de la 5-azacytidine rapportée à plusieurs reprises dans la littérature (Yoo et al., 2007), nous avons opté pour l'utilisation d'un deuxième inhibiteur, le SGI-1027 (**Figure 18**) qui n'est pas un analogue de la cytidine et agit donc par un autre mécanisme (Datta et al., 2009). Le SGI-1027 est un inhibiteur compétitif des DNMTs pour le SAM, le donneur de groupements « méthyles » utilisé par ces enzymes. Bien que l'étude du SGI-1027 a été réalisée sur des cellules humaines, la poche catalytique ciblée par le SGI-1027 est fortement conservée parmi les mammifères et suggère un mécanisme efficient dans les cellules murines (Bestor, 2000). Tout comme la 5-azacytidine, le SGI-1027 peut également induire une rapide dégradation de la DNMT1 par le protéasome (Datta et al., 2009).

Nous avons donc testé l'effet de ces inhibiteurs sur l'expression (au niveau du transcrit) des quatre adipokines d'intérêt. Les adipocytes ont été incubés avec ou sans FCCP en présence de la 5-azacytidine (24 h à 5 μ M) ou du SGI-1027 (48 h à 100 μ M) avant de mesurer l'abondance des transcrits en RT-qPCR pour la leptine, l'adiponectine, l'angiotensinogène et la résistine (**Figures 19 et 20**).

De manière surprenante, l'effet du FCCP sur la diminution de l'expression des adipokines n'est pas aussi important que celui observé lors de l'analyse du profil d'expression réalisée précédemment (**Figure 1**). Une différenciation plus faible observée dans cette expérience pourrait être à l'origine de ces différences. De plus, les adipocytes 3T3-L1 incubés en présence ou en absence de FCCP avec de la 5-azacytidine ou du SGI-1027 expriment encore plus faiblement les adipokines par rapport à la condition contrôle correspondante représentant des adipocytes ou des adipocytes incubés en présence de FCCP (**Figures 19 et 20**). Ces résultats suggèrent que les DNMTs participent probablement à la régulation du niveau d'expression des adipokines étudiées mais que l'augmentation de l'activité des DNMTs observée pour des adipocytes exposés au découplage mitochondrial n'est probablement pas responsable de la diminution d'expression des adipokines observée en réponse à une exposition au FCCP. En effet, si c'était le cas, on pourrait s'attendre intuitivement à ce que l'inhibition des DNMTs prévienne ou limite la diminution de

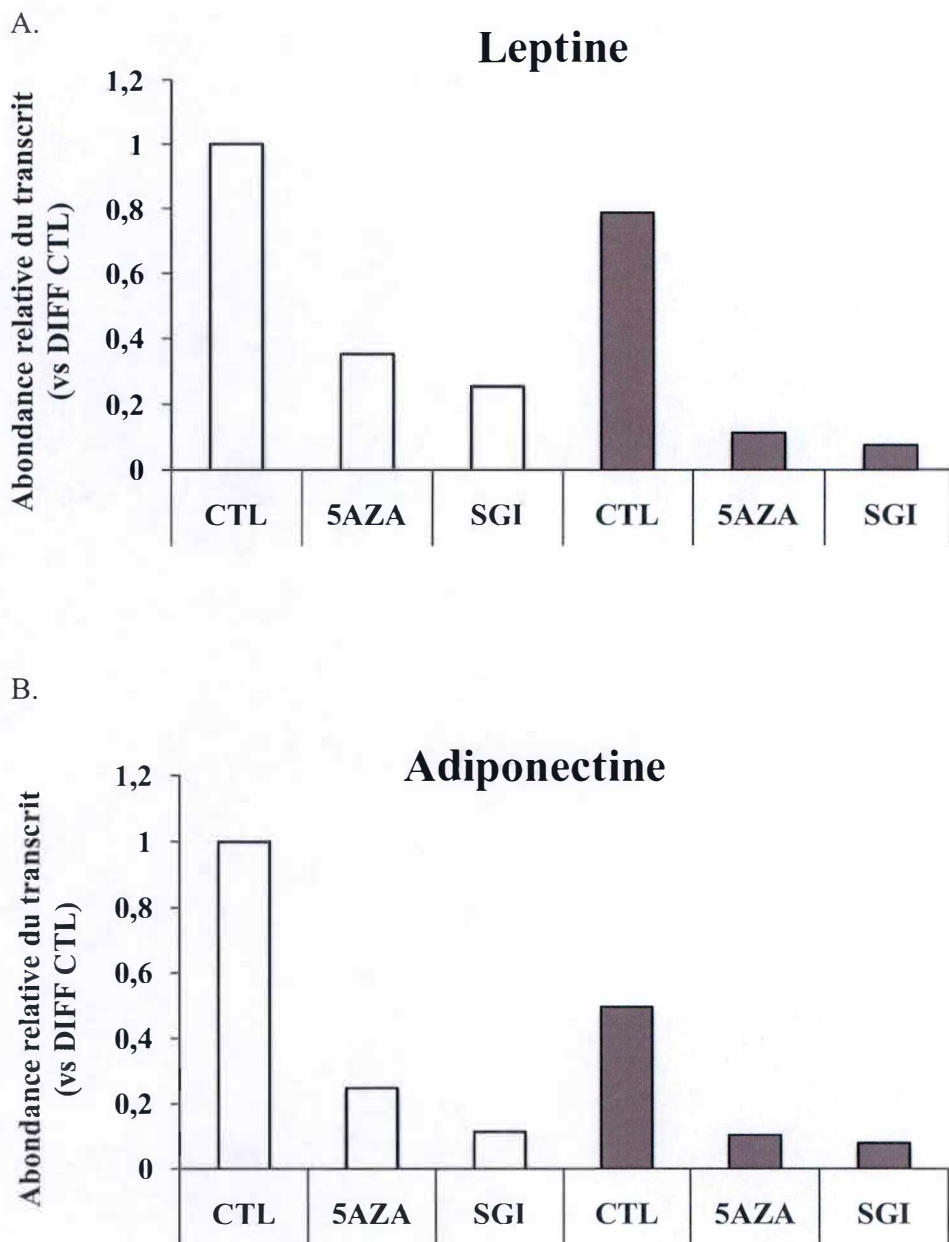


Figure 19 : Effet de l'inhibition des DNMTs par la 5-azacytidine ou le SGI-1027 sur l'expression de la leptine et de l'adiponectine.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés en absence (DIFF) ou en présence (FCCP) de 0,5 μ M FCCP pendant 3 jours. L'inhibiteur 5-azacytidine (5AZA) a été ajouté pendant les 24 dernières heures de traitement et l'inhibiteur SGI-1027 (SGI) a été ajouté pendant les 48 dernières heures d'incubation. Le contrôle représente des adipocytes incubés en absence ou en présence de FCCP sans inhibiteur (CTL). Au terme des incubations, une extraction d'ARNm a été effectuée en vue d'analyser l'abondance des transcrits de ces adipokines par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en abondance relative du transcrit pour la leptine (A.) et l'adiponectine (B.) par rapport aux adipocytes non traités (CTL) (n=1).

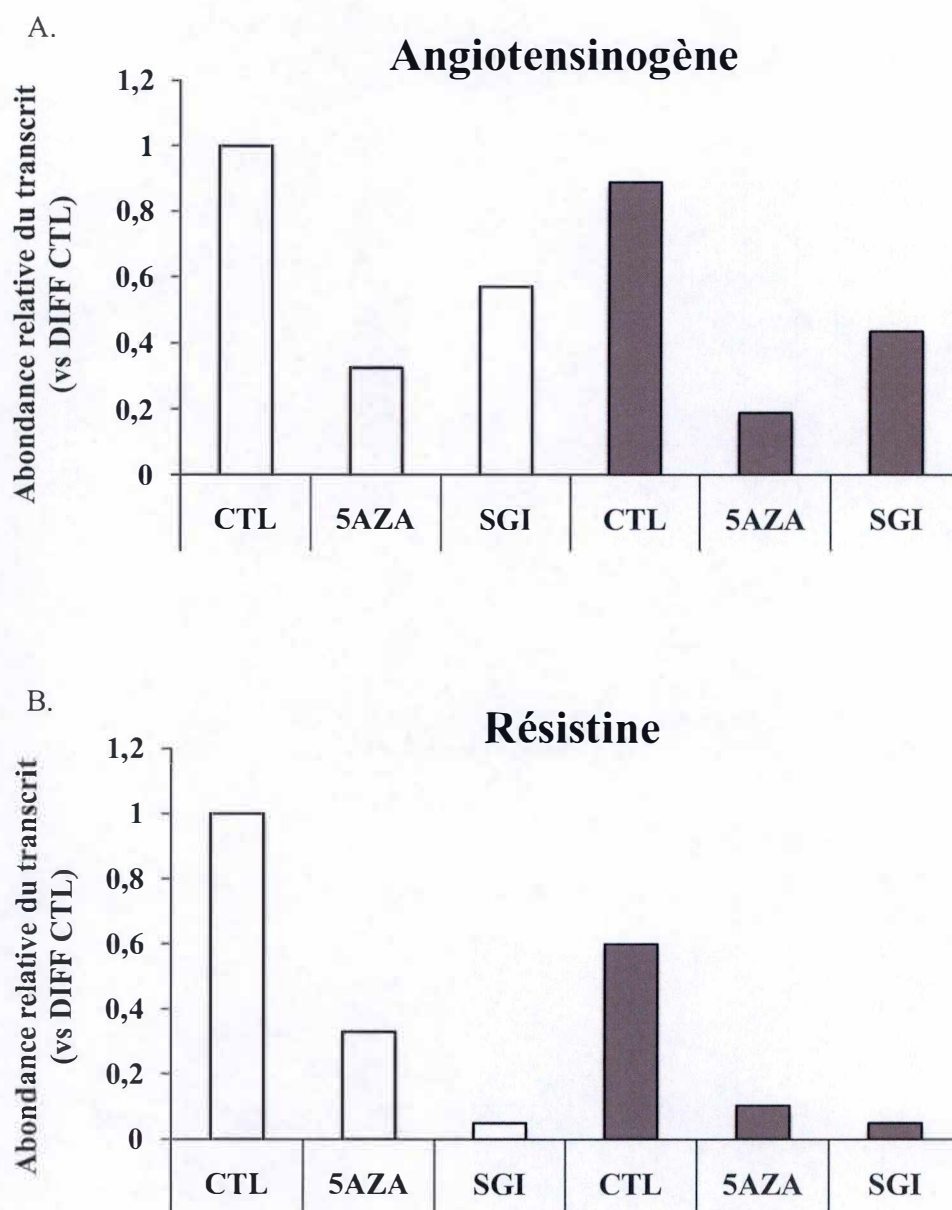


Figure 20 : Effet de l'inhibition des DNMTs par la 5-azacytidine ou le SGI-1027 sur l'expression de l'angiotensinogène et de la résistine.

Après 12 jours de différenciation, les adipocytes 3T3-L1 ont été incubés en absence (DIFF) ou en présence (FCCP) de 0,5 μ M FCCP pendant 3 jours. L'inhibiteur 5-azacytidine (5AZA) a été ajouté pendant les 24 dernières heures de traitement et l'inhibiteur SGI-1027 (SGI) a été ajouté pendant les 48 dernières heures d'incubation. Le contrôle représente des adipocytes incubés en absence ou en présence de FCCP sans inhibiteur (CTL). Au terme des incubations, une extraction d'ARNm a été effectuée en vue d'analyser l'abondance des transcrits de ces adipokines par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en abondance relative du transcrit pour l'angiotensinogène (A.) et la résistine (B.) par rapport aux adipocytes non traités (CTL).

l'expression des adipokines induite par le découplage mitochondrial. De plus, une certaine cytotoxicité, des effets pléiotropes de l'inhibition de ces enzymes, des effets indirects ou encore des effets non médiés par les DNMTs par ces inhibiteurs sur les adipocytes 3T3-L1 ne peuvent pas non plus être complètement exclus pour tenter d'expliquer l'effet inhibiteur très fort de ces inhibiteurs de DNMTs sur le niveau d'expression des adipokines.

5 Conclusion et perspectives

L'obésité et le diabète de type II sont souvent associés à des changements du profil d'expression et de sécrétion de plusieurs adipokines au niveau des tissus adipeux blancs qui peuvent contribuer à diverses complications et seraient responsables du syndrome métabolique (Lehr et al., 2012). Plusieurs études ont montré que l'induction d'un découplage mitochondrial *in vivo* s'accompagne d'une diminution du contenu en TG/TAG du tissu adipeux blanc (Kopecky et al., 1995), d'une diminution de l'hyper-triglycéridémie et d'une diminution des VLDLs (*Very Low Density Lipoprotein*) (Rossmeisl et al., 2005). Par ailleurs, une corrélation inverse a été observée entre le BMI et l'activité thermogénique du tissu adipeux brun médiée par un découplage mitochondrial physiologique (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Ces études établissent que le découplage mitochondrial, qu'il soit induit ou endogène, pourrait s'accompagner de répercussions physiologiques positives sur l'organisme comme l'amélioration des fonctions métaboliques et la perte de masse corporelle, en limitant l'expansion du tissu adipeux blanc.

Des données préliminaires obtenues au laboratoire montrent que l'induction d'un découplage mitochondrial modéré mais chronique dans les adipocytes 3T3-L1 diminue également l'expression d'adipokines comme la leptine, l'adiponectine et la résistine. Ces diminutions d'expression ont été confirmées par ELISA. En effet, une diminution de la sécrétion de ces adipokines dans le milieu de culture d'adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP a été observée (A. De Pauw, thèse de doctorat, 2010). Le premier objectif de ce mémoire consistait à étendre l'analyse de l'effet d'un découplage mitochondrial sur l'expression de 5 autres adipokines : l'angiotensinogène, l'apéline, la TSP-1, la chémérine et le SAA1.

Nous avons montré que l'induction d'un découplage mitochondrial diminue, parfois fortement et durablement, l'expression de la leptine, de l'adiponectine, de la résistine et de l'angiotensinogène dans des adipocytes 3T3-L1 exposés au découplage mitochondrial par une incubation en présence de FCCP et ce, pendant au moins 6 jours de traitement. De manière intéressante, rappelons que l'adiponectine, l'angiotensinogène et la résistine voient également leur expression diminuer dans les tissus adipeux où le découplage mitochondrial est activé par le froid ou par des ligands β -adrénergiques (Vernochet et al., 2009). De plus, l'expression de la leptine est inversement corrélée à l'expression d'UCP-1 dans les adipocytes bruns (Kraus et al., 2005). Des effets comparables au FCCP sur la diminution de l'expression de la leptine, de l'adiponectine, de la résistine et de l'angiotensinogène ont également été obtenus pour des stimulations par le TNF α (cytokine pro-inflammatoire également capable d'induire une diminution de l'expression de ces adipokines). Nous avons également observé une augmentation modérée de l'expression de l'apéline alors qu'une induction drastique sur l'expression du SAA1 est observée dans les adipocytes stimulés au TNF α . Si l'effet du SAA1 sur l'expression du TNF α a déjà été caractérisé dans les adipocytes (Yang et al., 2006), l'effet du TNF α sur l'augmentation de l'expression de SAA1 a déjà été observé dans des cellules d'hépatomes (Thorn et al., 2004) mais pas dans les adipocytes 3T3-L1. A notre connaissance, il s'agit de la première caractérisation de l'effet activateur du TNF α sur l'expression de SAA1 dans les adipocytes 3T3-L1. Par contre, en lien avec les propriétés pro-inflammatoires du

TNF α , il peut paraître étonnant de ne pas retrouver un effet stimulateur du TNF α sur l'expression de la TSP-1, une protéine multifonctionnelle retrouvée dans le tissu adipeux enflammé de patients obèses (Varma et al., 2008). Par ailleurs, Kong et ses collaborateurs révèlent que la stimulation d'adipocytes 3T3-L1 avec le TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor-Beta 1*) induit une augmentation significative de la synthèse de la TSP-1 suggérant un rôle stimulateur de TGF- β 1 dans la réponse inflammatoire (Kong et al., 2013).

Afin de confirmer les résultats obtenus sur le niveau d'expression des adipokines dans les adipocytes 3T3-L1 en réponse au découplage mitochondrial, il serait intéressant d'étudier ces effets dans un modèle plus pertinent d'un point de vue physiologique. Il serait intéressant d'investiguer l'effet de l'expression et de l'activation d'UCP-1 dans des adipocytes blancs sur le niveau d'expression des adipokines étudiées que ce soit sur des adipocytes blancs 3T3-L1 (Si et al., 2007) ou chez des souris transgéniques exprimant spécifiquement UCP-1 dans le tissu adipeux blanc à l'aide du promoteur du gène aP2 (Kopecky et al., 1995). Malheureusement, ces souris demandées au Prof. Kopecky dans le courant de ce travail ne sont plus disponibles dans la communauté scientifique. A défaut, nous pourrions utiliser une molécule de découplage mitochondrial de seconde génération qui a été développée récemment, le BAM15 (Kenwood et al., 2014). Outre sa faible cytotoxicité, ces auteurs ont montré que le BAM15 est caractérisé par une sélectivité accrue pour la membrane mitochondriale par rapport à tous les agents de découplage utilisés à ce jour. De plus, en testant le BAM15 sur des myoblastes (L6) de rat, les auteurs ont observé que les effets secondaires néfastes (comme la polarisation de la membrane plasmique ou la cytotoxicité induit par l'agent de découplage mitochondrial BAM15) sont inférieurs à ceux observés pour le FCCP.

Si nous montrons que le FCCP et le TNF α exercent tous 2 un effet inhibiteur de la sécrétion d'adipokines, les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de l'expression pourrait être différents entre des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNF α . En effet, alors que l'expression des gènes cibles de PPAR γ est restaurée en présence de ligands de PPAR γ (rosiglitazone et l'acide 9 cis-rétinoïque), aucune diminution de l'effet répresseur du FCCP sur l'expression de la leptine, de l'adiponectine et de l'angiotensinogène n'a pu être observée (A.-S. Gathy, mémoire, 2013). L'inhibition de l'expression de ces adipokines ne semble donc pas uniquement dépendre de la diminution de l'activité transactivatrice de PPAR γ dans les adipocytes incubés en présence de FCCP.

Nous avons donc émis l'hypothèse que des changements épigénétiques et/ou un remodelage de la chromatine pourrai(en)t expliquer (directement ou indirectement) une diminution du recrutement de facteurs de transcription comme PPAR γ et C/EBP α aux sites régulateurs présents dans les promoteurs des gènes codant pour ces adipokines.

L'analyse de l'effet du découplage mitochondrial sur l'activité nucléaire d'enzymes modificatrices de la chromatine montre que l'activité globale des DNMTs (**Figure 2A**) et des HDACs (**Figure 2B**) est plus élevée dans des adipocytes exposés au FCCP par rapport aux adipocytes contrôles alors que l'activité des enzymes TETs semble diminuer (**Figure 3**). Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle des changements épigénétiques et/ou des modifications de l'état de la chromatine pourraient participer à la modification de l'expression des adipokines dans les adipocytes exposés au FCCP. Dans ce travail, nous ne nous sommes

intéressés qu'à des changements de méthylation de l'ADN sur des tous petits fragments de promoteurs des 3 adipokines. Nous sommes bien conscients que cette approche est très limitée et réductrice pour appréhender la complexité des changements qui pourrait survenir. Une étude à l'échelle du génome, ou ciblée sur les séquences des gènes et promoteurs des adipokines étudiées serait certainement plus informative sur les changements induits en réponse au découplage mitochondrial.

La méthylation des îlots CpG localisés au niveau du promoteur du gène est généralement associée à la répression transcriptionnelle (Deaton et Bird, 2011). La leptine et l'angiotensinogène, deux adipokines étudiées dans ce travail et sous-exprimées en réponse au FCCP présentent un (voire deux pour la leptine) îlot(s) CpG dans leur promoteur. Le promoteur de la résistine, non étudié dans ce travail, possède également un îlot CpG (Methprimer). Que ce soit dans le promoteur de la leptine ou de l'angiotensinogène, le site de liaison de PPAR γ se trouve éloigné du site d'initiation de la transcription.

L'analyse de la méthylation de l'ADN montre que le découplage mitochondrial induit par le FCCP dans les adipocytes 3T3-L1 mène à une augmentation du taux de méthylation de l'îlot CpG du promoteur proximal de la leptine alors qu'aucun changement n'a pu être mis en évidence pour le fragment localisé dans la partie distale du promoteur la leptine ou le fragment du promoteur proximal de l'angiotensinogène. Malheureusement, les conditions pour la PCR nichée pour l'analyse de la méthylation dans le promoteur de la résistine n'ont pu être optimisées.

Chez la souris, une déméthylation du promoteur proximal de la leptine au cours de l'adipogenèse a déjà été rapportée dans la littérature (Yokomori et al., 2002). Elle implique 7 des 8 CpG présents au niveau du promoteur de la leptine. Le site CpG qui reste méthylé au cours de la différenciation cellulaire correspond au CpG du site de liaison de C/EBP α , lequel régule positivement l'expression de la leptine. Deux facteurs de transcription, C/EBP α (Miller et al., 1996) et Spl (Moreno-Aliaga, 2007) favorisent l'expression de la leptine quand ils sont liés au promoteur. Bien que la méthylation du CpG présent au niveau du site de liaison n'est pas associée à une diminution de la capacité de liaison du facteur de transcription, voir même la renforce pour C/EBP α (Rishi et al., 2010), il est cependant envisageable que l'hyperméthylation présente au niveau de sites CpG bordant la séquence de reconnaissance diminue la capacité de liaison de ce facteur à l'ADN. Une perspective intéressante à ce travail serait de tenter de vérifier cette hypothèse, par une analyse de l'interaction entre C/EBP α et Spl avec l'ADN au moyen d'une approche ChIP-PCR ciblée sur le promoteur de la leptine. Brièvement, après crosslink à la formaldéhyde, la chromatine d'adipocytes incubés en présence ou en absence de FCCP devra être fragmentée par sonication puis un anticorps dirigé spécifiquement contre le facteur de transcription d'intérêt permettra d'isoler les fragments de chromatine occupés par le facteur de transcription d'intérêt. Un couple de primers s'hybridant spécifiquement au fragment du promoteur d'intérêt permettra ensuite une analyse de l'abondance (enrichissement/appauvrissement) de la séquence par PCR quantitative en comparant l'abondance d'un fragment occupé par une protéine dont l'interaction et la distribution sur l'ADN n'est pas modifiée comme TFIID/TBP.

Le promoteur de la leptine chez l'humain montre également une variation de méthylation au cours de la différenciation (Miller et al., 2002). Au moyen de la technique de l'EMSA, ces auteurs ont pu déterminer qu'une protéine MECP2 est capable de reconnaître les

sites méthylés. Cette protéine est connue pour induire une compaction de la chromatine en recrutant les HDACs (Jones et al., 1998) une classe d'enzymes dont l'activité est augmentée dans les adipocytes exposés au FCCP (A.-S. Gathy, mémoire, 2013). Ainsi, la méthylation de l'ADN pourrait être couplée à des MPTs des histones via des protéines de reconnaissance de l'ADN méthylé telle que MECP2. En plus de recruter des HDACs, MECP2 peut aussi recruter des histones méthyltransférases (HMTs), ce qui pourrait également contribuer à la formation d'hétérochromatine au site ciblé par MECP2 (Mann et al., 2007).

Contrairement au promoteur proximal de la leptine, le taux de méthylation de la région distale du promoteur de l'angiotensinogène n'est pas modifié dans les adipocytes incubés en présence de FCCP. Si le changement du taux de méthylation dans les cellules incubées en présence de FCCP devait avoir un effet sur l'expression de l'angiotensinogène, il devrait donc être causé par un changement de statut de la méthylation d'un site CpG unique (hypo ou hyperméthylation) qui, à lui seul, pourrait affecter la liaison d'un ou de plusieurs facteur(s) de transcription. L'effet de la méthylation d'un site CpG unique sur des changements d'expression génique a déjà été rapporté dans la littérature.

Nous montrons également que la méthylation du fragment du promoteur distal du gène codant pour l'angiotensinogène n'est pas modifiée dans les adipocytes incubés en présence de FCCP. Une hypométhylation de l'ADN dans le promoteur proximal de l'angiotensinogène et du site d'initiation de la transcription a été associée à la liaison de C/EBP α . Bien que l'algorithme « Methprimer » n'ait pas pu identifier la présence d'îlots CpG dans cette région du promoteur, il pourrait également être intéressant d'analyser le profil de méthylation par séquençage clonal au bisulfite des sites CpG du site de liaison de C/EBP α mais aussi des séquences avoisinantes dans le promoteur proximal de l'angiotensinogène.

Dans le but de mieux comprendre les effets d'un découplage mitochondrial sur le processus de « dé-différenciation » des adipocytes et le rôle éventuel de la reméthylation de promoteurs de gènes déméthylés au cours de l'adipogenèse, il serait également intéressant d'analyser le taux de méthylation de promoteurs de gènes ne codant pas pour des adipokines comme le gène codant pour le transporteur de glucose (GLUT4) connu pour être activé par une déméthylation du promoteur au cours de la différenciation (Yokomori et al., 1999). De plus, l'expression de GLUT4 est également diminuée en réponse au FCCP (Tejerina et al., 2009). Le promoteur de PPAR γ serait également une cible intéressante puisqu'il a été montré que ce promoteur est hyperméthylé dans les pré-adipocytes 3T3-L1 puis graduellement déméthylé au cours de l'adipogenèse (Fujiki et al., 2009).

Afin de tenter de rechercher l'implication éventuelle des DNMTs (dont l'activité globale est augmentée dans les cellules exposées au découplage mitochondrial) dans la diminution de l'expression des adipokines obtenue dans les adipocytes exposés au FCCP, nous avons tenté d'optimiser les conditions de silençage des DNMTs (DNMT1, DNMT3a). Le silençage des DNMTs à l'aide de différents siRNAs (bien que très efficace au niveau du transcrit de DNMT1 en réponse au siRNA dirigé spécifiquement contre le messenger du gène codant cette méthyltransférase) ne nous a pas permis de déterminer si une DNMT est impliquée dans l'hyperméthylation du fragment du promoteur proximal du gène codant pour la leptine analysé. Ajoutons encore que l'efficacité de ces siRNAs et/ou l'efficacité de transfection par électroporation semble(nt) relativement faible(s). Dans ces conditions, il nous

a été difficile d'observer des changements dans l'abondance et/ou l'activité des enzymes dans les adipocytes électroporés avec des siRNAs dirigés contre la DNMT1 ou la DNMT3a. Cependant, nous remarquons que le silençage de la DNMT1 limite légèrement la diminution de l'expression des gènes codant les adipokines étudiées dans les adipocytes incubés en présence de FCCP. Pour tenter d'améliorer les conditions et de limiter les interférences liées à l'électroporation des cellules, nous devrions probablement envisager de transduire les cellules à l'aide de lentivirus délivrant des shRNAs visant à assurer l'inhibition d'expression des DNMTs au lieu de provoquer un knock-down dans des cellules électroporées à l'aide de siRNAs.

En effet, bien que l'électroporation ne semble pas affecter l'activité des DNMTs, nous pouvons remarquer que les cellules électroporées présentent un profil de méthylation différent et une diminution d'expression des adipokines plus faible que dans les cellules non électroporées suggérant que l'électroporation interfère avec les tests et paramètres expérimentaux étudiés.

Il a été observé au laboratoire que l'électroporation provoque une diminution du contenu en TG/TAG dans les adipocytes différenciés et n'est pas neutre sur le niveau d'expression génique, modifiant ainsi la biologie de la cellule électroporée.

Nous avons tout de même tenté de contourner l'électroporation et ses effets indésirables (interférence sur la biologie de la cellule, faible efficacité de transfection, ...) en utilisant des inhibiteurs chimiques des DNMTs comme la 5-azacytidine et le SGI-1027. L'incubation d'adipocytes 3T3-L1 avec ces inhibiteurs conduit à une diminution de l'expression des adipokines étudiées. Ce résultat est difficilement interprétable et incompatible avec un rôle de l'augmentation de l'activité des DNMTs dans les adipocytes incubés en présence de FCCP dans la diminution de l'expression des adipokines observée dans ces conditions.

En conclusion, les résultats obtenus en présence de ces inhibiteurs suggèrent donc que l'augmentation de l'activité des DNMTs et l'hyperméthylation observée dans le promoteur proximal de la leptine ne jouerait pas un rôle déterminant dans l'inhibition de l'expression de la leptine et de l'angiotensinogène dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial.

Enfin, bien que non étudiées dans le cadre de ce travail, plusieurs MPTs d'histones ont été rapportées pour activer ou inhiber l'expression d'adipokines comme la leptine et l'adiponectine (Sakurai et al., 2009). Au cours de la différenciation, la transition de toutes les formes méthylées vers la forme acétylée de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9) a été observée au niveau du promoteur de l'adiponectine. Le traitement d'adipocytes 3T3-L1 avec le TNF α est connu pour réprimer l'expression de l'adiponectine et est associé à une diminution d'acétylation de l'H3K9 du promoteur de l'adiponectine (Sakurai et al., 2009). De plus, des modifications épigénétiques ont été récemment identifiées au niveau du promoteur de la leptine chez des souris obèses induites par un régime riche en graisses comme la méthylation de l'H3K9 (H3K9me). Le recrutement de HDACs au niveau du promoteur de la leptine a également été observé chez ces souris. Ce type d'analyses devrait également être réalisé dans le futur dans des adipocytes incubés en présence de FCCP à la recherche de changements impactant le remodelage de la chromatine qui pourraient être responsables ou contribuer à la diminution de l'expression des adipokines dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial.

En conclusion, les données obtenues pour un stress métabolique comme l'induction d'un découplage mitochondrial peut impacter la régulation épigénétique de certains fragments d'ADN contenus dans le promoteur de certains gènes codant pour des adipokines comme celui de la leptine. Nous nous sommes concentrés sur la méthylation de l'ADN en tant que marque épigénétique potentiellement répressive de la transcription bien que la recherche de MPTs sur les histones serait également nécessaire afin de compléter notre analyse. En effet, il semble que les marques d'hyperméthylation du promoteur de la leptine identifiées et l'augmentation de l'activité des DNMTs dans les adipocytes exposés au découplage mitochondrial ne soient pas impliquées dans la diminution de l'expression des adipokines dans un contexte de stress mitochondrial que représente le découplage mitochondrial induit par le FCCP. Il faudrait donc à l'avenir s'intéresser davantage aux enzymes TETs, aux changements de la conformation de la chromatine et modifier la stratégie (transduction lentivirale en remplacement de l'électroporation) visant à moduler le niveau d'activité des enzymes dans les adipocytes. De plus, il serait nécessaire d'étudier le promoteur de gènes dont la déméthylation est connue pour activer l'expression de gènes adipogéniques au cours de la différenciation comme c'est le cas pour la leptine, GLUT4 et PPAR γ . En analysant le taux de méthylation du promoteur de ces gènes dans les adipocytes exposés au FCCP, nous pourrions éventuellement associer une reméthylation de l'ADN, induite par le découplage mitochondrial, à un état de différenciation ou de dé-différenciation cellulaire. Ainsi, le taux de méthylation de l'ADN dans ces régions pourrait représenter une signature épigénétique utilisable comme un indicateur de l'état différencié ou « dé-différencié » des adipocytes exposés à un stress métabolique causé par un découplage mitochondrial.

6 Bibliographie

- ABEL, E. D., PERONI, O., KIM, J. K., KIM, Y. B., BOSS, O., HADRO, E., MINNEMANN, T., SHULMAN, G. I. & KAHN, B. B. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409, 729-33.
- ADAMS, A., LEONG, C., DENNY, W. A. & GUSS, J. M. 2005. Structures of two minor-groove-binding quinolinium quaternary salts complexed with d(CGCGAATTCGCG)(2) at 1.6 and 1.8 Angstrom resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61, 1348-53.
- ADKINS, N. L. & GEORGEL, P. T. 2011. MeCP2: structure and function. *Biochem Cell Biol*, 89, 1-11.
- ALEFFI, S., PETRAI, I., BERTOLANI, C., PAROLA, M., COLOMBATTO, S., NOVO, E., VIZZUTTI, F., ANANIA, F. A., MILANI, S., ROMBOUTS, K., LAFFI, G., PINZANI, M. & MARRA, F. 2005. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 42, 1339-48.
- ALTOMONTE, J., RICHTER, A., HARBARAN, S., SURIAWINATA, J., NAKAE, J., THUNG, S. N., MESECK, M., ACCILI, D. & DONG, H. 2003. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E718-28.
- ARAUJO, F. D., CROTEAU, S., SLACK, A. D., MILUTINOVIC, S., BIGEY, P., PRICE, G. B., ZANNIS-HADJOPOULOS, M. & SZYF, M. 2001. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem*, 276, 6930-6.
- ARDEHALI, M. B. & LIS, J. T. 2009. Tracking rates of transcription and splicing in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 1123-4.
- ASHLEY, E. A., POWERS, J., CHEN, M., KUNDU, R., FINSTERBACH, T., CAFFARELLI, A., DENG, A., EICHHORN, J., MAHAJAN, R., AGRAWAL, R., GREVE, J., ROBBINS, R., PATTERSON, A. J., BERNSTEIN, D. & QUERTERMOUS, T. 2005. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res*, 65, 73-82.
- AWAZAWA, M., UEKI, K., INABE, K., YAMAUCHI, T., KANEKO, K., OKAZAKI, Y., BARDEESY, N., OHNISHI, S., NAGAI, R. & KADOWAKI, T. 2009. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 51-6.
- BALKAU, B., CHARLES, M. A., DRIVSHOLM, T., BORCH-JOHNSEN, K., WAREHAM, N., YUDKIN, J. S., MORRIS, R., ZAVARONI, I., VAN DAM, R., FESKINS, E., GABRIEL, R., DIET, M., NILSSON, P., HEDBLAD, B. & EUROPEAN GROUP FOR THE STUDY OF INSULIN, R. 2002. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab*, 28, 364-76.
- BANERJEE, R. R., RANGWALA, S. M., SHAPIRO, J. S., RICH, A. S., RHOADES, B., QI, Y., WANG, J., RAJALA, M. W., POCAI, A., SCHERER, P. E., STEPPAN, C. M., AHIMA, R. S., OBICI, S., ROSSETTI, L. & LAZAR, M. A. 2004. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*, 303, 1195-8.
- BARBATELLI, G., MURANO, I., MADSEN, L., HAO, Q., JIMENEZ, M., KRISTIANSEN, K., GIACOBINO, J. P., DE MATTEIS, R. & CINTI, S. 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E1244-53.
- BARTELT, A., BRUNS, O. T., REIMER, R., HOHENBERG, H., ITTRICH, H., PELDSCHUS, K., KAUL, M. G., TROMSDORF, U. I., WELLER, H., WAURISCH, C., EYCHMULLER, A., GORDTS, P. L., RINNINGER, F., BRUEGELMANN, K., FREUND, B., NIELSEN, P., MERKEL, M. & HEEREN, J. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, 17, 200-5.
- BAUER, S., WANNINGER, J., SCHMIDHOFER, S., WEIGERT, J., NEUMEIER, M., DORN, C., HELLERBRAND, C., ZIMARA, N., SCHAFFLER, A., ASLANIDIS, C. & BUECHLER, C. 2011. Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. *Endocrinology*, 152, 26-35.

- BENGOECHEA-ALONSO, M. T. & ERICSSON, J. 2007. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 215-22.
- BESTOR, T. H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9, 2395-402.
- BOKAREWA, M., NAGAEV, I., DAHLBERG, L., SMITH, U. & TARKOWSKI, A. 2005. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*, 174, 5789-95.
- BOSTICK, M., KIM, J. K., ESTEVE, P. O., CLARK, A., PRADHAN, S. & JACOBSEN, S. E. 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 317, 1760-4.
- BOUCHER, J., MASRI, B., DAVIAUD, D., GESTA, S., GUIGNE, C., MAZZUCOTELLI, A., CASTAN-LAURELL, I., TACK, I., KNIBIEHLER, B., CARPENE, C., AUDIGIER, Y., SAULNIER-BLACHE, J. S. & VALET, P. 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 146, 1764-71.
- BUCHOVECKY, C. M., TURLEY, S. D., BROWN, H. M., KYLE, S. M., MCDONALD, J. G., LIU, B., PIEPER, A. A., HUANG, W., KATZ, D. M., RUSSELL, D. W., SHENDURE, J. & JUSTICE, M. J. 2013. A suppressor screen in *Mecp2* mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nat Genet*, 45, 1013-20.
- CABASSI, A., COGHI, P., GOVONI, P., BAROUHIEL, E., SPERONI, E., CAVAZZINI, S., CANTONI, A. M., SCANDROGLIO, R. & FIACCADORI, E. 2005. Sympathetic modulation by carvedilol and losartan reduces angiotensin II-mediated lipolysis in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2888-97.
- CANI, P. D. 2014. Metabolism in 2013: The gut microbiota manages host metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 74-6.
- CANI, P. D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., KNAUF, C., BURCELIN, R. G., TUOHY, K. M., GIBSON, G. R. & DELZENNE, N. M. 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50, 2374-83.
- CAPRIO, M., FEVE, B., CLAES, A., VIENGCHAREUN, S., LOMBES, M. & ZENNARO, M. C. 2007. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*, 21, 2185-94.
- CARONE, B. R., FAUQUIER, L., HABIB, N., SHEA, J. M., HART, C. E., LI, R., BOCK, C., LI, C., GU, H., ZAMORE, P. D., MEISSNER, A., WENG, Z., HOFMANN, H. A., FRIEDMAN, N. & RANDO, O. J. 2010. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 143, 1084-96.
- CARROLL, W. X., KALUPAHANA, N. S., BOOKER, S. L., SIRIWARDHANA, N., LEMIEUX, M., SAXTON, A. M. & MOUSTAID-MOUSSA, N. 2013. Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 10.
- CATALAN, V., GOMEZ-AMBROSI, J., RODRIGUEZ, A., RAMIREZ, B., ROTELLAR, F., VALENTI, V., SILVA, C., GIL, M. J., SALVADOR, J. & FRUHBECK, G. 2013. Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor- α stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *Surg Obes Relat Dis*, 9, 306-14.
- CHEN, C. C., WANG, K. Y. & SHEN, C. K. 2012. The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J Biol Chem*, 287, 33116-21.
- CHEN, C. H., WANG, P. H., LIU, B. H., HSU, H. H., MERSMANN, H. J. & DING, S. T. 2008. Serum amyloid A protein regulates the expression of porcine genes related to lipid metabolism. *J Nutr*, 138, 674-9.
- CHEN, H., CHARLAT, O., TARTAGLIA, L. A., WOOLF, E. A., WENG, X., ELLIS, S. J., LAKEY, N. D., CULPEPPER, J., MOORE, K. J., BREITBART, R. E., DUYK, G. M., TEPPER, R. I. & MORGENSTERN, J. P. 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell*, 84, 491-5.

- CHEN, T. & DENT, S. Y. 2014. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet*, 15, 93-106.
- CHEUNG, A. C. & CRAMER, P. 2012. A movie of RNA polymerase II transcription. *Cell*, 149, 1431-7.
- CHO, Y. M., YOUN, B. S., CHUNG, S. S., KIM, K. W., LEE, H. K., YU, K. Y., PARK, H. J., SHIN, H. D. & PARK, K. S. 2004. Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*, 47, 559-65.
- CHUNG, S. S., CHOI, H. H., KIM, K. W., CHO, Y. M., LEE, H. K. & PARK, K. S. 2005. Regulation of human resistin gene expression in cell systems: an important role of stimulatory protein 1 interaction with a common promoter polymorphic site. *Diabetologia*, 48, 1150-8.
- COMBS, T. P., WAGNER, J. A., BERGER, J., DOEBBER, T., WANG, W. J., ZHANG, B. B., TANEN, M., BERG, A. H., O'RAHILLY, S., SAVAGE, D. B., CHATTERJEE, K., WEISS, S., LARSON, P. J., GOTTESDIENER, K. M., GERTZ, B. J., CHARRON, M. J., SCHERER, P. E. & MOLLER, D. E. 2002. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*, 143, 998-1007.
- CONSIDINE, R. V., SINHA, M. K., HEIMAN, M. L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T. W., NYCE, M. R., OHANNESIAN, J. P., MARCO, C. C., MCKEE, L. J., BAUER, T. L. & ET AL. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334, 292-5.
- CRISTANCHO, A. G. & LAZAR, M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-34.
- CYPESS, A. M., LEHMAN, S., WILLIAMS, G., TAL, I., RODMAN, D., GOLDFINE, A. B., KUO, F. C., PALMER, E. L., TSENG, Y. H., DORIA, A., KOLODNY, G. M. & KAHN, C. R. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360, 1509-17.
- DATTA, J., GHOSHAL, K., DENNY, W. A., GAMAGE, S. A., BROOKE, D. G., PHIASIVONGSA, P., REDKAR, S. & JACOB, S. T. 2009. A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res*, 69, 4277-85.
- DAVIAUD, D., BOUCHER, J., GESTA, S., DRAY, C., GUIGNE, C., QUILLIOT, D., AYAV, A., ZIEGLER, O., CARPENE, C., SAULNIER-BLACHE, J. S., VALET, P. & CASTAN-LAURELL, I. 2006. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*, 20, 1528-30.
- DE MOTA, N., REAUX-LE GOAZIGO, A., EL MESSARI, S., CHARTREL, N., ROESCH, D., DUJARDIN, C., KORDON, C., VAUDRY, H., MOOS, F. & LLORENS-CORTES, C. 2004. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10464-9.
- DE SENY, D., COBRAIVILLE, G., CHARLIER, E., NEUVILLE, S., ESSER, N., MALAISE, D., MALAISE, O., CALVO, F. Q., RELIC, B. & MALAISE, M. G. 2013. Acute-phase serum amyloid a in osteoarthritis: regulatory mechanism and proinflammatory properties. *PLoS One*, 8, e66769.
- DE VOS, P., LEFEBVRE, A. M., MILLER, S. G., GUERRE-MILLO, M., WONG, K., SALADIN, R., HAMANN, L. G., STAELS, B., BRIGGS, M. R. & AUWERX, J. 1996. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*, 98, 1004-9.
- DEATON, A. M. & BIRD, A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25, 1010-22.
- DEGAWA-YAMAUCHI, M., MOSS, K. A., BOVENKERK, J. E., SHANKAR, S. S., MORRISON, C. L., LELLIOTT, C. J., VIDAL-PUIG, A., JONES, R. & CONSIDINE, R. V. 2005. Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes Res*, 13, 662-9.
- DEPLUS, R., BLANCHON, L., RAJAVELU, A., BOUKABA, A., DEFRANCE, M., LUCIANI, J., ROTHE, F., DEDEURWAERDER, S., DENIS, H., BRINKMAN, A. B., SIMMER, F., MULLER, F., BERTIN, B.,

- BERDASCO, M., PUTMANS, P., CALONNE, E., LITCHFIELD, D. W., DE LAUNOIT, Y., JURKOWSKI, T. P., STUNNENBERG, H. G., BOCK, C., SOTIRIOU, C., FRAGA, M. F., ESTELLER, M., JELTSCH, A. & FUKS, F. 2014. Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Rep*, 8, 743-53.
- DIETRICH, M. O. & HORVATH, T. L. 2009. Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci*, 30, 1688-96.
- DIETZE, D., KOENEN, M., ROHRIG, K., HORIKOSHI, H., HAUNER, H. & ECKEL, J. 2002. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes*, 51, 2369-76.
- DORAN, A. C., MELLER, N., CUTCHINS, A., DELIRI, H., SLAYTON, R. P., OLDHAM, S. N., KIM, J. B., KELLER, S. R. & MCNAMARA, C. A. 2008. The helix-loop-helix factors Id3 and E47 are novel regulators of adiponectin. *Circ Res*, 103, 624-34.
- DROGAT, J. & HERMAND, D. 2012. Gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation. *Mol Microbiol*, 84, 995-1004.
- EDENS, N. K., LEIBEL, R. L. & HIRSCH, J. 1990. Mechanism of free fatty acid re-esterification in human adipocytes in vitro. *J Lipid Res*, 31, 1423-31.
- EGLOFF, S. & MURPHY, S. 2008. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet*, 24, 280-8.
- ELABD, C., COUSIN, W., CHEN, R. Y., CHOOLJIAN, M. S., PHAM, J. T., CONBOY, I. M. & CONBOY, M. J. 2013. DNA methyltransferase-3-dependent nonrandom template segregation in differentiating embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 203, 73-85.
- ENERBACK, S. 2010. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*, 11, 248-52.
- ENGELI, S., SCHLING, P., GORZELNIAK, K., BOSCHMANN, M., JANKE, J., AILHAUD, G., TEBOUL, M., MASSIERA, F. & SHARMA, A. M. 2003. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 807-25.
- ERNST, M. C., HAIDL, I. D., ZUNIGA, L. A., DRANSE, H. J., ROURKE, J. L., ZABEL, B. A., BUTCHER, E. C. & SINAL, C. J. 2012. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology*, 153, 672-82.
- FASSHAUER, M., KLEIN, J., NEUMANN, S., ESZLINGER, M. & PASCHKE, R. 2001. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 1027-31.
- FEDORENKO, A., LISHKO, P. V. & KIRICHOK, Y. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCPI uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151, 400-13.
- FEUERER, M., HERRERO, L., CIPOLLETTA, D., NAAZ, A., WONG, J., NAYER, A., LEE, J., GOLDFINE, A. B., BENOIST, C., SHOELSON, S. & MATHIS, D. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, 15, 930-9.
- FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., DE OLIVEIRA, E. M., SANDRI, S., KNEBEL, F. H., ALBUQUERQUE, R. C. & CAMPA, A. 2012. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, 36, 1032-9.
- FLEGAL, K. M., CARROLL, M. D., OGDEN, C. L. & CURTIN, L. R. 2010. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*, 303, 235-41.
- FORNERIS, F., BINDA, C., VANONI, M. A., MATTEVI, A. & BATTAGLIOLI, E. 2005. Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. *FEBS Lett*, 579, 2203-7.
- FOX, K. E., COLTON, L. A., ERICKSON, P. F., FRIEDMAN, J. E., CHA, H. C., KELLER, P., MACDOUGALD, O. A. & KLEMM, D. J. 2008. Regulation of cyclin D1 and Wnt10b gene expression by cAMP-responsive element-binding protein during early adipogenesis involves differential promoter methylation. *J Biol Chem*, 283, 35096-105.

- FRAUER, C., HOFFMANN, T., BULTMANN, S., CASA, V., CARDOSO, M. C., ANTES, I. & LEONHARDT, H. 2011. Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain. *PLoS One*, 6, e21306.
- FREDERICH, R. C., LOLLMANN, B., HAMANN, A., NAPOLITANO-ROSEN, A., KAHN, B. B., LOWELL, B. B. & FLIER, J. S. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*, 96, 1658-63.
- FREDRIKSON, G., TORNQVIST, H. & BELFRAGE, P. 1986. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*, 876, 288-93.
- FRONTINI, A. & CINTI, S. 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*, 11, 253-6.
- FROST, G., SLEETH, M. L., SAHURI-ARISOYLU, M., LIZARBE, B., CERDAN, S., BRODY, L., ANASTASOVSKA, J., GHOURAB, S., HANKIR, M., ZHANG, S., CARLING, D., SWANN, J. R., GIBSON, G., VIARDOT, A., MORRISON, D., LOUISE THOMAS, E. & BELL, J. D. 2014. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*, 5, 3611.
- FUJIKI, K., KANO, F., SHIOTA, K. & MURATA, M. 2009. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol*, 7, 38.
- FUJIKI, K., SHINODA, A., KANO, F., SATO, R., SHIRAHIGE, K. & MURATA, M. 2013. PPARgamma-induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Commun*, 4, 2262.
- FUKE, T., YOSHIKAWA, T., KONDO, M., MORINO, K., OBATA, T., UGI, S., NISHIO, Y., MAEDA, S., KASHIWAGI, A. & MAEGAWA, H. 2010. Transcription factor AP-2beta inhibits expression and secretion of leptin, an insulin-sensitizing hormone, in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obes (Lond)*, 34, 670-8.
- GAINSFORD, T., WILLSON, T. A., METCALF, D., HANDMAN, E., MCFARLANE, C., NG, A., NICOLA, N. A., ALEXANDER, W. S. & HILTON, D. J. 1996. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14564-8.
- GARCIA-CARDONA, M. C., HUANG, F., GARCIA-VIVAS, J. M., LOPEZ-CAMARILLO, C., DEL RIO NAVARRO, B. E., NAVARRO OLIVOS, E., HONG-CHONG, E., BOLANOS-JIMENEZ, F. & MARCHAT, L. A. 2014. DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, 38, 1457-65.
- GARVEY, W. T., RYAN, D. H., LOOK, M., GADDE, K. M., ALLISON, D. B., PETERSON, C. A., SCHWIERS, M., DAY, W. W. & BOWDEN, C. H. 2012. Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUENCE): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study. *Am J Clin Nutr*, 95, 297-308.
- GEIGER, K., MUENDLEIN, A., STARK, N., SAELY, C. H., WABITSCH, M., FRAUNBERGER, P. & DREXEL, H. 2011. Hypoxia induces apelin expression in human adipocytes. *Horm Metab Res*, 43, 380-5.
- GEORGE, A. J., THOMAS, W. G. & HANNAN, R. D. 2010. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*, 10, 745-59.
- GHOSHAL, K., DATTA, J., MAJUMDER, S., BAI, S., KUTAY, H., MOTIWALA, T. & JACOB, S. T. 2005. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, 25, 4727-41.
- GIACCHETTI, G., FALOIA, E., SARDU, C., CAMILLONI, M. A., MARINIELLO, B., GATTI, C., GARRAPA, G. G., GUERRIERI, M. & MANTERO, F. 2000. Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 2, S142-3.

- GONZALEZ, E. & MCGRAW, T. E. 2006. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 17, 4484-93.
- GORALSKI, K. B., MCCARTHY, T. C., HANNIMAN, E. A., ZABEL, B. A., BUTCHER, E. C., PARLEE, S. D., MURUGANANDAN, S. & SINAL, C. J. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*, 282, 28175-88.
- GRANOWITZ, E. V. 1997. Transforming growth factor-beta enhances and pro-inflammatory cytokines inhibit ob gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 240, 382-5.
- GREEN, A., DOBIAS, S. B., WALTERS, D. J. & BRASIER, A. R. 1994. Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology*, 134, 2581-8.
- GREEN, H. & KEHINDE, O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5, 19-27.
- GREEN, H. & MEUTH, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-33.
- GUILHERME, A., VIRBASIOUS, J. V., PURI, V. & CZECH, M. P. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-77.
- GUPTA, R. K., ARANY, Z., SEALE, P., MEPANI, R. J., YE, L., CONROE, H. M., ROBY, Y. A., KULAGA, H., REED, R. R. & SPIEGELMAN, B. M. 2010. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*, 464, 619-23.
- HAJRI, T., HALL, A. M., JENSEN, D. R., PIETKA, T. A., DROVER, V. A., TAO, H., ECKEL, R. & ABUMRAD, N. A. 2007. CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes*, 56, 1872-80.
- HANSEN, I. R., JANSSON, K. M., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2014. Contrasting effects of cold acclimation versus obesogenic diets on chemerin gene expression in brown and brite adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 1691-1699.
- HARMS, M. & SEALE, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19, 1252-63.
- HARPER, J. A., DICKINSON, K. & BRAND, M. D. 2001. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev*, 2, 255-65.
- HARTMAN, H. B., HU, X., TYLER, K. X., DALAL, C. K. & LAZAR, M. A. 2002. Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem*, 277, 19754-61.
- HASHIMOTO, H., LIU, Y., UPADHYAY, A. K., CHANG, Y., HOWERTON, S. B., VERTINO, P. M., ZHANG, X. & CHENG, X. 2012. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*, 40, 4841-9.
- HATZIVASSILIOU, G., ZHAO, F., BAUER, D. E., ANDREADIS, C., SHAW, A. N., DHANAK, D., HINGORANI, S. R., TUVESON, D. A. & THOMPSON, C. B. 2005. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8, 311-21.
- HAUGEN, F., JORGENSEN, A., DREVON, C. A. & TRAYHURN, P. 2001. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 507, 105-8.
- HELLMAN, A. & CHESS, A. 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, 315, 1141-3.
- HIGUCHI, K., MASAKI, T., GOTOH, K., CHIBA, S., KATSURAGI, I., TANAKA, K., KAKUMA, T. & YOSHIMATSU, H. 2007. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*, 148, 2690-7.

HINNEY, A., VOGEL, C. I. & HEBEBRAND, J. 2010. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19, 297-310.

HOLCOMB, I. N., KABAKOFF, R. C., CHAN, B., BAKER, T. W., GURNEY, A., HENZEL, W., NELSON, C., LOWMAN, H. B., WRIGHT, B. D., SKELTON, N. J., FRANTZ, G. D., TUMAS, D. B., PEALE, F. V., JR., SHELTON, D. L. & HEBERT, C. C. 2000. FIZZI, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*, 19, 4046-55.

HOLLENBERG, A. N., SUSULIC, V. S., MADURA, J. P., ZHANG, B., MOLLER, D. E., TONTONNOZ, P., SARRAF, P., SPIEGELMAN, B. M. & LOWELL, B. B. 1997. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem*, 272, 5283-90.

HONDARES, E., ROSELL, M., DIAZ-DELFIN, J., OLMOS, Y., MONSALVE, M., IGLESIAS, R., VILLARROYA, F. & GIRALT, M. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem*, 286, 43112-22.

HONG, L., SCHROTH, G. P., MATTHEWS, H. R., YAU, P. & BRADBURY, E. M. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*, 268, 305-14.

HORGAN, G. W. & STUBBS, J. 2003. Predicting basal metabolic rate in the obese is difficult. *Eur J Clin Nutr*, 57, 335-40.

HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L. & SPIEGELMAN, B. M. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95, 2409-15.

HOTTA, K., FUNAHASHI, T., BODKIN, N. L., ORTMAYER, H. K., ARITA, Y., HANSEN, B. C. & MATSUZAWA, Y. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 50, 1126-33.

HOUDE, A. A., LEGARE, C., HOULD, F. S., LEBEL, S., MARCEAU, P., TCHERNOF, A., VOHL, M. C., HIVERT, M. F. & BOUCHARD, L. 2014. Cross-tissue comparisons of leptin and adiponectin: DNA methylation profiles. *Adipocyte*, 3, 132-40.

HWANG, C. S., MANDRUP, S., MACDOUGALD, O. A., GEIMAN, D. E. & LANE, M. D. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 873-7.

IMAI, T., TAKAKUWA, R., MARCHAND, S., DENTZ, E., BORNERT, J. M., MESSADDEQ, N., WENDLING, O., MARK, M., DESVERGNE, B., WAHLI, W., CHAMBON, P. & METZGER, D. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4543-7.

IWAI, M. & HORIUCHI, M. 2009. Role of renin-angiotensin system in adipose tissue dysfunction. *Hypertens Res*, 32, 425-7.

JACKSON, V., SHIRES, A., CHALKLEY, R. & GRANNER, D. K. 1975. Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones. *J Biol Chem*, 250, 4856-63.

JANKE, J., ENGELI, S., GORZELNIAK, K., LUFT, F. C. & SHARMA, A. M. 2002. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res*, 10, 1-5.

JASTROCH, M., KEIPERT, S. & PEROCCHI, F. 2014. From explosives to physiological combustion: Next generation chemical uncouplers. *Mol Metab*, 3, 86-7.

JIN, W., TAKAGI, T., KANESASHI, S. N., KURAHASHI, T., NOMURA, T., HARADA, J. & ISHII, S. 2006. Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev Cell*, 10, 461-71.

- JONES, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484-92.
- JONES, P. A. & LIANG, G. 2009. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 10, 805-11.
- KAJIMURA, S., SEALE, P., TOMARU, T., ERDJUMENT-BROMAGE, H., COOPER, M. P., RUAS, J. L., CHIN, S., TEMPST, P., LAZAR, M. A. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*, 22, 1397-409.
- KALLEN, C. B. & LAZAR, M. A. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5793-6.
- KANG, E. S., PARK, C. W. & CHUNG, J. H. 2001. Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 862-8.
- KAPLAN, L. M. 2005. Pharmacological therapies for obesity. *Gastroenterol Clin North Am*, 34, 91-104.
- KASER, S., KASER, A., SANDHOFER, A., EBENBICHLER, C. F., TILG, H. & PATSCH, J. R. 2003. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 286-90.
- KEIPERT, S. & JASTROCH, M. 2014. Brite/beige fat and UCPI - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta*, 1837, 1075-82.
- KEMP, J. R., UNAL, H., DESNOYER, R., YUE, H., BHATNAGAR, A. & KARNIK, S. S. 2014. Angiotensin II-regulated microRNA 483-3p directly targets multiple components of the renin-angiotensin system. *J Mol Cell Cardiol*, 75, 25-39.
- KIM, J. B., SARRAF, P., WRIGHT, M., YAO, K. M., MUELLER, E., SOLANES, G., LOWELL, B. B. & SPIEGELMAN, B. M. 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*, 101, 1-9.
- KINTSCHER, U., HARTGE, M., HESS, K., FORYST-LUDWIG, A., CLEMENZ, M., WABITSCH, M., FISCHER-POSOVSZKY, P., BARTH, T. F., DRAGUN, D., SKURK, T., HAUNER, H., BLUHER, M., UNGER, T., WOLF, A. M., KNIPPSCHILD, U., HOMBACH, V. & MARX, N. 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1304-10.
- KISHIKAWA, S., MURATA, T., UGAI, H., YAMAZAKI, T. & YOKOYAMA, K. K. 2003. Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. *Nucleic Acids Res Suppl*, 307-8.
- KOH, K. P. & RAO, A. 2013. DNA methylation and methylcytosine oxidation in cell fate decisions. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 152-61.
- KOHLI, R. M. & ZHANG, Y. 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472-9.
- KONG, P., GONZALEZ-QUESADA, C., LI, N., CAVALERA, M., LEE, D. W. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2013. Thrombospondin-1 regulates adiposity and metabolic dysfunction in diet-induced obesity enhancing adipose inflammation and stimulating adipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305, E439-50.
- KOPECKY, J., CLARKE, G., ENERBACK, S., SPIEGELMAN, B. & KOZAK, L. P. 1995. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*, 96, 2914-23.
- KOUZINE, F., WOJTOWICZ, D., YAMANE, A., RESCH, W., KIEFFER-KWON, K. R., BANDLE, R., NELSON, S., NAKAHASHI, H., AWASTHI, P., FEIGENBAUM, L., MENONI, H., HOEIJMAKERS, J., VERMEULEN, W., GE, H., PRZYTYCKA, T. M., LEVENS, D. & CASELLAS, R. 2013. Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes. *Cell*, 153, 988-99.

KRAUS, D., JAGER, J., MEIER, B., FASSHAUER, M. & KLEIN, J. 2005. Aldosterone inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes. *Horm Metab Res*, 37, 455-9.

KUEHNER, J. N., PEARSON, E. L. & MOORE, C. 2011. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 283-94.

KUMADA, M., KIHARA, S., OUCHI, N., KOBAYASHI, H., OKAMOTO, Y., OHASHI, K., MAEDA, K., NAGARETANI, H., KISHIDA, K., MAEDA, N., NAGASAWA, A., FUNAHASHI, T. & MATSUZAWA, Y. 2004. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*, 109, 2046-9.

KWON, H. & PESSIN, J. E. 2013. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 71.

LAFONTAN, M. & LANGIN, D. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48, 275-97.

LANGIN, D., DICKER, A., TAVERNIER, G., HOFFSTEDT, J., MAIRAL, A., RYDEN, M., ARNER, E., SICARD, A., JENKINS, C. M., VIGUERIE, N., VAN HARMELEN, V., GROSS, R. W., HOLM, C. & ARNER, P. 2005. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 54, 3190-7.

LAURENT, L., WONG, E., LI, G., HUYNH, T., TSIRIGOS, A., ONG, C. T., LOW, H. M., KIN SUNG, K. W., RIGOUTSOS, I., LORING, J. & WEI, C. L. 2010. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 20, 320-31.

LAW, J. A. & JACOBSEN, S. E. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11, 204-20.

LAWLER, J., SUNDAY, M., THIBERT, V., DUQUETTE, M., GEORGE, E. L., RAYBURN, H. & HYNES, R. O. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest*, 101, 982-92.

LEE, Y. H., PETKOVA, A. P., MOTTILLO, E. P. & GRANNEMAN, J. G. 2012. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*, 15, 480-91.

LEFTEROVA, M. I., HAAKONSSON, A. K., LAZAR, M. A. & MANDRUP, S. 2014. PPARgamma and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 293-302.

LEFTEROVA, M. I., ZHANG, Y., STEGER, D. J., SCHUPP, M., SCHUG, J., CRISTANCHO, A., FENG, D., ZHUO, D., STOECKERT, C. J., JR., LIU, X. S. & LAZAR, M. A. 2008. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*, 22, 2941-52.

LEHR, S., HARTWIG, S., LAMERS, D., FAMULLA, S., MULLER, S., HANISCH, F. G., CUVELIER, C., RUIGE, J., ECKARDT, K., OUWENS, D. M., SELL, H. & ECKEL, J. 2012. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics*, 11, M111 010504.

LEIBEL, R. L., HIRSCH, J., BERRY, E. M. & GRUEN, R. K. 1985. Alterations in adipocyte free fatty acid re-esterification associated with obesity and weight reduction in man. *Am J Clin Nutr*, 42, 198-206.

LEWIS, K. E., KIRK, E. A., MCDONALD, T. O., WANG, S., WIGHT, T. N., O'BRIEN, K. D. & CHAIT, A. 2004. Increase in serum amyloid A evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation*, 110, 540-5.

LEY, R. E., BACKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11070-5.

LI, E., BESTOR, T. H. & JAENISCH, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-26.

LI, L. C. & DAHIYA, R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18, 1427-31.

- LI, S., SHIN, H. J., DING, E. L. & VAN DAM, R. M. 2009. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 302, 179-88.
- LIDELL, M. E., BETZ, M. J. & ENERBACK, S. 2014. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*, 3, 63-6.
- LIM, J. Y., KIM, W. H. & PARK, S. I. 2008. GO6976 prevents TNF- α -induced suppression of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes: putative involvement of protein kinase C. *FEBS Lett*, 582, 3473-8.
- LIN, W. Y., DUBUISSON, O., RUBICZ, R., LIU, N., ALLISON, D. B., CURRAN, J. E., COMUZZIE, A. G., BLANGERO, J., LEACH, C. T., GORING, H. & DHURANDHAR, N. V. 2013. Long-term changes in adiposity and glycemic control are associated with past adenovirus infection. *Diabetes Care*, 36, 701-7.
- LING, Y., SANKPAL, U. T., ROBERTSON, A. K., MCNALLY, J. G., KARPOVA, T. & ROBERTSON, K. D. 2004. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res*, 32, 598-610.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOENARZ, C. & SCHOFIELD, C. J. 2008. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol*, 4, 152-6.
- LOENARZ, C. & SCHOFIELD, C. J. 2011. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci*, 36, 7-18.
- LONDONO GENTILE, T., LU, C., LODATO, P. M., TSE, S., OLEJNICZAK, S. H., WITZE, E. S., THOMPSON, C. B. & WELLEN, K. E. 2013. DNMT1 is regulated by ATP-citrate lyase and maintains methylation patterns during adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 33, 3864-78.
- LONG, H. K., BLACKLEDGE, N. P. & KLOSE, R. J. 2013. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans*, 41, 727-40.
- LORD, G. M., MATARESE, G., HOWARD, J. K., BAKER, R. J., BLOOM, S. R. & LECHLER, R. I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394, 897-901.
- LUMENG, C. N., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117, 175-84.
- MADSEN, M. S., SIERSBAEK, R., BOERGESEN, M., NIELSEN, R. & MANDRUP, S. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol Cell Biol*, 34, 939-54.
- MASSIERA, F., BLOCH-FAURE, M., CEILER, D., MURAKAMI, K., FUKAMIZU, A., GASC, J. M., QUIGNARD-BOULANGE, A., NEGREL, R., AILHAUD, G., SEYDOUX, J., MENETON, P. & TEBOUL, M. 2001. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*, 15, 2727-9.
- MATSUSHITA, K., WU, Y., OKAMOTO, Y., PRATT, R. E. & DZAU, V. J. 2006. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension*, 48, 1095-102.
- MAURY, E. & BRICHARD, S. M. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314, 1-16.
- MAURY, E., NOEL, L., DETRY, R. & BRICHARD, S. M. 2009. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor- α contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 1393-400.
- MAZZUCOTELLI, A., RIBET, C., CASTAN-LAURELL, I., DAVIAUD, D., GUIGNE, C., LANGIN, D. & VALET, P. 2008. The transcriptional co-activator PGC-1 α up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept*, 150, 33-7.

- MCGILLICUDDY, F. C., CHIQUOINE, E. H., HINKLE, C. C., KIM, R. J., SHAH, R., ROCHE, H. M., SMYTH, E. M. & REILLY, M. P. 2009. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem*, 284, 31936-44.
- MEGEE, P. C., MORGAN, B. A. & SMITH, M. M. 1995. Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev*, 9, 1716-27.
- MELLEN, M., AYATA, P., DEWELL, S., KRIAUCIONIS, S. & HEINTZ, N. 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151, 1417-30.
- MELZNER, I., SCOTT, V., DORSCH, K., FISCHER, P., WABITSCH, M., BRUDERLEIN, S., HASEL, C. & MOLLER, P. 2002. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*, 277, 45420-7.
- MEYER, L. K., CIARALDI, T. P., HENRY, R. R., WITTGROVE, A. C. & PHILLIPS, S. A. 2013. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*, 2, 217-26.
- MICHEL, M. & CRAMER, P. 2013. Transitions for regulating early transcription. *Cell*, 153, 943-4.
- MILLER, R. A., CHU, Q., LE LAY, J., SCHERER, P. E., AHIMA, R. S., KAESTNER, K. H., FORETZ, M., VIOLLET, B. & BIRNBAUM, M. J. 2011. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest*, 121, 2518-28.
- MILLER, S. G., DE VOS, P., GUERRE-MILLO, M., WONG, K., HERMANN, T., STAELS, B., BRIGGS, M. R. & AUWERX, J. 1996. The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5507-11.
- MORENO-ALIAGA, M. J., SWARBRICK, M. M., LORENTE-CEBRIAN, S., STANHOPE, K. L., HAVEL, P. J. & MARTINEZ, J. A. 2007. Spl-mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *J Mol Endocrinol*, 38, 537-46.
- MORRISON, C. D., MORTON, G. J., NISWENDER, K. D., GELLING, R. W. & SCHWARTZ, M. W. 2005. Leptin inhibits hypothalamic Npy and AgRP gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E1051-7.
- MULLEN, K. L., PRITCHARD, J., RITCHIE, I., SNOOK, L. A., CHABOWSKI, A., BONEN, A., WRIGHT, D. & DYCK, D. J. 2009. Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R243-51.
- MURR, R., LOIZOU, J. I., YANG, Y. G., CUENIN, C., LI, H., WANG, Z. Q. & HERCEG, Z. 2006. Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 8, 91-9.
- MURUGANANDAN, S., PARLEE, S. D., ROURKE, J. L., ERNST, M. C., GORALSKI, K. B. & SINAL, C. J. 2011. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. *J Biol Chem*, 286, 23982-95.
- NAKAHATA, Y., SAHAR, S., ASTARITA, G., KALUZOVA, M. & SASSONE-CORSI, P. 2009. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 324, 654-7.
- NEDERGAARD, J., BENGTSSON, T. & CANNON, B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E444-52.
- O'BRIEN, K. D. & CHAIT, A. 2006. Serum amyloid A: the "other" inflammatory protein. *Curr Atheroscler Rep*, 8, 62-8.
- OHNO, H., SHINODA, K., OHYAMA, K., SHARP, L. Z. & KAJIMURA, S. 2013. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*, 504, 163-7.
- OHSAWA, M., TAMURA, K., WAKUI, H., MAEDA, A., DEJIMA, T., KANAOKA, T., AZUSHIMA, K., UNEDA, K., TSURUMI-IKEYA, Y., KOBAYASHI, R., MATSUDA, M., UCHIDA, S., TOYA, Y., KOBORI, H., NISHIYAMA, A., YAMASHITA, A., ISHIKAWA, Y. & UMEMURA, S. 2014. Deletion of the angiotensin

II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension. *Kidney Int*, 86, 570-81.

OKAMOTO, Y., KIHARA, S., OUCHI, N., NISHIDA, M., ARITA, Y., KUMADA, M., OHASHI, K., SAKAI, N., SHIMOMURA, I., KOBAYASHI, H., TERASAKA, N., INABA, T., FUNAHASHI, T. & MATSUZAWA, Y. 2002. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 106, 2767-70.

OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A. & LI, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.

OKUNO, M., ARIMOTO, E., NISHIZUKA, M., NISHIHARA, T. & IMAGAWA, M. 2002. Isolation of up- or down-regulated genes in PPARgamma-expressing NIH-3T3 cells during differentiation into adipocytes. *FEBS Lett*, 519, 108-12.

OOI, S. K., QIU, C., BERNSTEIN, E., LI, K., JIA, D., YANG, Z., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., LIN, S. P., ALLIS, C. D., CHENG, X. & BESTOR, T. H. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448, 714-7.

ORCI, L., COOK, W. S., RAVAZZOLA, M., WANG, M. Y., PARK, B. H., MONTESANO, R. & UNGER, R. H. 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2058-63.

PAL, M. & LUSE, D. S. 2002. Strong natural pausing by RNA polymerase II within 10 bases of transcription start may result in repeated slippage and reextension of the nascent RNA. *Mol Cell Biol*, 22, 30-40.

PARK, A., KIM, W. K. & BAE, K. H. 2014. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, 6, 33-42.

PARKER, N., CRICHTON, P. G., VIDAL-PUIG, A. J. & BRAND, M. D. 2009. Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 41, 335-42.

PARLEE, S. D., ERNST, M. C., MURUGANANDAN, S., SINAL, C. J. & GORALSKI, K. B. 2010. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*, 151, 2590-602.

PATEL, L., BUCKELS, A. C., KINGHORN, I. J., MURDOCK, P. R., HOLBROOK, J. D., PLUMPTON, C., MACPHEE, C. H. & SMITH, S. A. 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 472-6.

PATTERSON, K., MOLLOY, L., QU, W. & CLARK, S. 2011. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*.

PAULL, T. T., ROGAKOU, E. P., YAMAZAKI, V., KIRCHGESSNER, C. U., GELLERT, M. & BONNER, W. M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 10, 886-95.

PETROVIC, N., WALDEN, T. B., SHABALINA, I. G., TIMMONS, J. A., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, 285, 7153-64.

POITOU, C., VIGUERIE, N., CANCELLO, R., DE MATTEIS, R., CINTI, S., STICH, V., COUSSIEU, C., GAUTHIER, E., COURTINE, M., ZUCKER, J. D., BARSH, G. S., SARIS, W., BRUNEVAL, P., BASDEVANT, A., LANGIN, D. & CLEMENT, K. 2005. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia*, 48, 519-28.

POITOUT, V., AMYOT, J., SEMACHE, M., ZARROUKI, B., HAGMAN, D. & FONTES, G. 2010. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 289-98.

POPKIN, B. M., ADAIR, L. S. & NG, S. W. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*, 70, 3-21.

- PRIETO-HONTORIA, P. L., PEREZ-MATUTE, P., FERNANDEZ-GALILEA, M., MARTINEZ, J. A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2011. Lipoic acid inhibits leptin secretion and Srebp1 activity in adipocytes. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1059-69.
- RAMIS, J. M., FRANSSEN-VAN HAL, N. L., KRAMER, E., LLADO, I., BOUILLAUD, F., PALOU, A. & KEIJER, J. 2002. Carboxypeptidase E and thrombospondin-1 are differently expressed in subcutaneous and visceral fat of obese subjects. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1960-71.
- REMACLE, C., BIESWAL, F., BOL, V. & REUSENS, B. 2011. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *Am J Clin Nutr*, 94, 1846S-1852S.
- RIGOTTI, A., MIETTINEN, H. E. & KRIEGER, M. 2003. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 24, 357-87.
- RISHI, V., BHATTACHARYA, P., CHATTERJEE, R., ROZENBERG, J., ZHAO, J., GLASS, K., FITZGERALD, P. & VINSON, C. 2010. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBPalpha binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20311-6.
- ROBERTSON, K. D., KEYOMARSI, K., GONZALES, F. A., VELICESCU, M. & JONES, P. A. 2000. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 28, 2108-13.
- ROMACHO, T., ELSSEN, M., ROHRBORN, D. & ECKEL, J. 2014. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)*, 210, 733-53.
- ROSEN, E. D. & SPIEGELMAN, B. M. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444, 847-53.
- ROSENWALD, M., PERDIKARI, A., RULICKE, T. & WOLFRUM, C. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*, 15, 659-67.
- ROSENWALD, M. & WOLFRUM, C. 2014. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*, 3, 4-9.
- ROSSMEISL, M., KOVAR, J., SYROVY, I., FLACHS, P., BOBKOVA, D., KOLAR, F., POLEDNE, R. & KOPECKY, J. 2005. Triglyceride-lowering effect of respiratory uncoupling in white adipose tissue. *Obes Res*, 13, 835-44.
- RUAN, H., HACHEN, N., GOLUB, T. R., VAN PARIJS, L. & LODISH, H. F. 2002. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*, 51, 1319-36.
- RUDD, M. D., IZBAN, M. G. & LUSE, D. S. 1994. The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8057-61.
- SAINT-MARC, P., KOZAK, L. P., AILHAUD, G., DARIMONT, C. & NEGREL, R. 2001. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*, 142, 487-92.
- SAKURAI, N., MOCHIZUKI, K. & GODA, T. 2009. Modifications of histone H3 at lysine 9 on the adiponectin gene in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 55, 131-8.
- SAXONOV, S., BERG, P. & BRUTLAG, D. L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1412-7.
- SCHIESSER, S., HACKNER, B., PFAFFENEDER, T., MULLER, M., HAGEMEIERS, C., TRUSS, M. & CARELL, T. 2012. Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51, 6516-20.
- SCHMIDT, S. F., JORGENSEN, M., CHEN, Y., NIELSEN, R., SANDELIN, A. & MANDRUP, S. 2011. Cross species comparison of C/EBPalpha and PPARgamma profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics*, 12, 152.

- SCHWARTZ, M. W., SEELEY, R. J., WOODS, S. C., WEIGLE, D. S., CAMPFIELD, L. A., BURN, P. & BASKIN, D. G. 1997. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46, 2119-23.
- SEALE, P., BJORK, B., YANG, W., KAJIMURA, S., CHIN, S., KUANG, S., SCIME, A., DEVARAKONDA, S., CONROE, H. M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., RUDNICKI, M. A., BEIER, D. R. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454, 961-7.
- SELL, H., LAURENCIKIENE, J., TAUBE, A., ECKARDT, K., CRAMER, A., HORRIGHS, A., ARNER, P. & ECKEL, J. 2009. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*, 58, 2731-40.
- SELLAR, G. C., JORDAN, S. A., BICKMORE, W. A., FANTES, J. A., VAN HEYNINGEN, V. & WHITEHEAD, A. S. 1994. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. *Genomics*, 19, 221-7.
- SEO, J. B., NOH, M. J., YOO, E. J., PARK, S. Y., PARK, J., LEE, I. K., PARK, S. D. & KIM, J. B. 2003. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein- α . *Mol Endocrinol*, 17, 1522-33.
- SHABALINA, I. G., OST, M., PETROVIC, N., VRBACKY, M., NEDERGAARD, J. & CANNON, B. 2010. Uncoupling protein-1 is not leaky. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 773-84.
- SHAN, T., LIANG, X., BI, P., ZHANG, P., LIU, W. & KUANG, S. 2013. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res*, 54, 2214-24.
- SHARIF, J., MUTO, M., TAKEBAYASHI, S., SUETAKE, I., IWAMATSU, A., ENDO, T. A., SHINGA, J., MIZUTANI-KOSEKI, Y., TOYODA, T., OKAMURA, K., TAJIMA, S., MITSUYA, K., OKANO, M. & KOSEKI, H. 2007. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, 450, 908-12.
- SHEN, W., WANG, C., XIA, L., FAN, C., DONG, H., DECKELBAUM, R. J. & QI, K. 2014. Epigenetic modification of the leptin promoter in diet-induced obese mice and the effects of N-3 polyunsaturated fatty acids. *Sci Rep*, 4, 5282.
- SHOJIMA, N., SAKODA, H., OGIHARA, T., FUJISHIRO, M., KATAGIRI, H., ANAI, M., ONISHI, Y., ONO, H., INUKAI, K., ABE, M., FUKUSHIMA, Y., KIKUCHI, M., OKA, Y. & ASANO, T. 2002. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes*, 51, 1737-44.
- SHUKLA, S., KAVAK, E., GREGORY, M., IMASHIMIZU, M., SHUTINOSKI, B., KASHLEV, M., OBERDOERFFER, P., SANDBERG, R. & OBERDOERFFER, S. 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, 479, 74-9.
- SI, Y., PALANI, S., JAYARAMAN, A. & LEE, K. 2007. Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. *J Lipid Res*, 48, 826-36.
- SI, Y., SHI, H. & LEE, K. 2009. Metabolic flux analysis of mitochondrial uncoupling in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One*, 4, e7000.
- SMALLWOOD, A., ESTEVE, P. O., PRADHAN, S. & CAREY, M. 2007. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev*, 21, 1169-78.
- SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P. O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B. A., BERGMANN, O., BLOMQVIST, L., HOFFSTEDT, J., NASLUND, E., BRITTON, T., CONCHA, H., HASSAN, M., RYDEN, M., FRISEN, J. & ARNER, P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783-7.
- STEGE, D. J., GRANT, G. R., SCHUPP, M., TOMARU, T., LEFTEROVA, M. I., SCHUG, J., MANDUCHI, E., STOECKERT, C. J., JR. & LAZAR, M. A. 2010. Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev*, 24, 1035-44.

STEPPAN, C. M., BAILEY, S. T., BHAT, S., BROWN, E. J., BANERJEE, R. R., WRIGHT, C. M., PATEL, H. R., AHIMA, R. S. & LAZAR, M. A. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409, 307-12.

STEPPAN, C. M., WANG, J., WHITEMAN, E. L., BIRNBAUM, M. J. & LAZAR, M. A. 2005. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol*, 25, 1569-75.

STOGER, R. 2006. In vivo methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics*, 1, 155-62.

SUGII, S. & EVANS, R. M. 2011. Epigenetic codes of PPARgamma in metabolic disease. *FEBS Lett*, 585, 2121-8.

SUMITHRAN, P. & PROIETTO, J. 2014. Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Saf*, 37, 597-608.

TAHILIANI, M., KOH, K. P., SHEN, Y., PASTOR, W. A., BANDUKWALA, H., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., IYER, L. M., LIU, D. R., ARAVIND, L. & RAO, A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324, 930-5.

TAKAHASHI, H., MCCAFFERY, J. M., IRIZARRY, R. A. & BOEKE, J. D. 2006. Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol Cell*, 23, 207-17.

TAKAHASHI, M., OKIMURA, Y., IGUCHI, G., NISHIZAWA, H., YAMAMOTO, M., SUDA, K., KITAZAWA, R., FUJIMOTO, W., TAKAHASHI, K., ZOLOTARYOV, F. N., HONG, K. S., KIYONARI, H., ABE, T., KAJI, H., KITAZAWA, S., KASUGA, M., CHIHARA, K. & TAKAHASHI, Y. 2011. Chemerin regulates beta-cell function in mice. *Sci Rep*, 1, 123.

TAKAI, D. & JONES, P. A. 2004. Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol Biol Evol*, 21, 463-7.

TAKASE, H., FURUCHI, H., TANAKA, M., YAMADA, T., MATOBA, K., IWASAKI, K., KAWAKAMI, T. & MUKAI, T. 2014. Characterization of reconstituted high-density lipoprotein particles formed by lipid interactions with human serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 1467-74.

TALBERT, P. B. & HENIKOFF, S. 2010. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 264-75.

TAMKUN, J. W., DEURING, R., SCOTT, M. P., KISSINGER, M., PATTATUCCI, A. M., KAUFMAN, T. C. & KENNISON, J. A. 1992. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*, 68, 561-72.

TAN, M., LUO, H., LEE, S., JIN, F., YANG, J. S., MONTELLIER, E., BUCHOU, T., CHENG, Z., ROUSSEAU, S., RAJAGOPAL, N., LU, Z., YE, Z., ZHU, Q., WYSOCKA, J., YE, Y., KHOCHBIN, S., REN, B. & ZHAO, Y. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146, 1016-28.

TARAKJI, A. M., MORALES, F. & ROVITO, P. 2007. Hepatobiliary scintigraphy as a diagnostic modality for gastroparesis of the bypassed stomach after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*, 17, 414-5.

TATEMOTO, K., HOSOYA, M., HABATA, Y., FUJII, R., KAKEGAWA, T., ZOU, M. X., KAWAMATA, Y., FUKUSUMI, S., HINUMA, S., KITADA, C., KUROKAWA, T., ONDA, H. & FUJINO, M. 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 471-6.

TAYLOR, S. M. & JONES, P. A. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17, 771-9.

TEJERINA, S., DE PAUW, A., VANKONINGSLOO, S., HOUBION, A., RENARD, P., DE LONGUEVILLE, F., RAES, M. & ARNOULD, T. 2009. Mild mitochondrial uncoupling induces 3T3-L1 adipocyte de-differentiation by a PPARgamma-independent mechanism, whereas TNFalpha-induced de-differentiation is PPARgamma dependent. *J Cell Sci*, 122, 145-55.

TEPERINO, R., SCHOONJANS, K. & AUWERX, J. 2010. Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab*, 12, 321-7.

TIMMONS, J. A., WENNMALM, K., LARSSON, O., WALDEN, T. B., LASSMANN, T., PETROVIC, N., HAMILTON, D. L., GIMENO, R. E., WAHLESTEDT, C., BAAR, K., NEDERGAARD, J. & CANNON, B. 2007. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4401-6.

TIRABY, C., TAVERNIER, G., LEFORT, C., LARROUY, D., BOUILLAUD, F., RICQUIER, D. & LANGIN, D. 2003. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem*, 278, 33370-6.

TONTONOZ, P., HU, E., GRAVES, R. A., BUDAVARI, A. I. & SPIEGELMAN, B. M. 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 8, 1224-34.

TSENG, Y. H., CYPESS, A. M. & KAHN, C. R. 2010. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 465-82.

TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.

TURNBAUGH, P. J., RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 1, 6ra14.

UNNIKRISHNAN, A., GAFKEN, P. R. & TSUKIYAMA, T. 2010. Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 430-7.

VALINLUCK, V., TSAI, H. H., ROGSTAD, D. K., BURDZY, A., BIRD, A. & SOWERS, L. C. 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 32, 4100-8.

VARMA, V., YAO-BORENGASSER, A., BODLES, A. M., RASOULI, N., PHANAVANH, B., NOLEN, G. T., KERN, E. M., NAGARAJAN, R., SPENCER, H. J., 3RD, LEE, M. J., FRIED, S. K., MCGEHEE, R. E., JR., PETERSON, C. A. & KERN, P. A. 2008. Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes*, 57, 432-9.

VERGNES, L., CHIN, R., YOUNG, S. G. & REUE, K. 2011. Heart-type fatty acid-binding protein is essential for efficient brown adipose tissue fatty acid oxidation and cold tolerance. *J Biol Chem*, 286, 380-90.

VERNOCHET, C., PERES, S. B., DAVIS, K. E., MCDONALD, M. E., QIANG, L., WANG, H., SCHERER, P. E. & FARMER, S. R. 2009. C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol Cell Biol*, 29, 4714-28.

VIRTANEN, K. A., LIDELL, M. E., ORAVA, J., HEGLIND, M., WESTERGREN, R., NIEMI, T., TAITTONEN, M., LAINE, J., SAVISTO, N. J., ENERBACK, S. & NUUTILA, P. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 360, 1518-25.

WAKI, H., YAMAUCHI, T., KAMON, J., ITO, Y., UCHIDA, S., KITA, S., HARA, K., HADA, Y., VASSEUR, F., FROGUEL, P., KIMURA, S., NAGAI, R. & KADOWAKI, T. 2003. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*, 278, 40352-63.

WALLACE, D. C. & FAN, W. 2010. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, 10, 12-31.

WANG, J., ALEXANDER, P., WU, L., HAMMER, R., CLEAVER, O. & MCKNIGHT, S. L. 2009. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science*, 325, 435-9.

WANG, Y., BEYDOUN, M. A., LIANG, L., CABALLERO, B. & KUMANYIKA, S. K. 2008. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 2323-30.

- WEIR, G. C., LAYBUTT, D. R., KANETO, H., BONNER-WEIR, S. & SHARMA, A. 2001. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, 50 Suppl 1, S154-9.
- WERNER, F. 2012. A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life. *J Mol Biol*, 417, 13-27.
- WHEATLEY, K. E., NOGUEIRA, L. M., PERKINS, S. N. & HURSTING, S. D. 2011. Differential effects of calorie restriction and exercise on the adipose transcriptome in diet-induced obese mice. *J Obes*, 2011, 265417.
- WIJESEKARA, N., KRISHNAMURTHY, M., BHATTACHARJEE, A., SUHAIL, A., SWEENEY, G. & WHEELER, M. B. 2010. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *J Biol Chem*, 285, 33623-31.
- WITTAMER, V., FRANSSSEN, J. D., VULCANO, M., MIRJOLET, J. F., LE POUL, E., MIGEOTTE, I., BREZILLON, S., TYLDESLEY, R., BLANPAIN, C., DETHEUX, M., MANTOVANI, A., SOZZANI, S., VASSART, G., PARMENTIER, M. & COMMUNI, D. 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, 198, 977-85.
- WRANN, C. D., EGUCHI, J., BOZEC, A., XU, Z., MIKKELSEN, T., GIMBLE, J., NAVE, H., WAGNER, E. F., ONG, S. E. & ROSEN, E. D. 2012. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. *J Clin Invest*, 122, 1010-21.
- WU, J., BOSTROM, P., SPARKS, L. M., YE, L., CHOI, J. H., GIANG, A. H., KHANDEKAR, M., VIRTANEN, K. A., NUUTILA, P., SCHAART, G., HUANG, K., TU, H., VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D., HOEKS, J., ENERBACK, S., SCHRAUWEN, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150, 366-76.
- WU, Z., JIAO, P., HUANG, X., FENG, B., FENG, Y., YANG, S., HWANG, P., DU, J., NIE, Y., XIAO, G. & XU, H. 2010. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. *J Clin Invest*, 120, 3901-11.
- WU, Z., ROSEN, E. D., BRUN, R., HAUSER, S., ADELMANT, G., TROY, A. E., MCKEON, C., DARLINGTON, G. J. & SPIEGELMAN, B. M. 1999. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 3, 151-8.
- XU, A., WANG, Y., KESHAW, H., XU, L. Y., LAM, K. S. & COOPER, G. J. 2003. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*, 112, 91-100.
- XU, Y., WU, F., TAN, L., KONG, L., XIONG, L., DENG, J., BARBERA, A. J., ZHENG, L., ZHANG, H., HUANG, S., MIN, J., NICHOLSON, T., CHEN, T., XU, G., SHI, Y., ZHANG, K. & SHI, Y. G. 2011. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 42, 451-64.
- XU, Y., XU, C., KATO, A., TEMPEL, W., ABREU, J. G., BIAN, C., HU, Y., HU, D., ZHAO, B., CEROVINA, T., DIAO, J., WU, F., HE, H. H., CUI, Q., CLARK, E., MA, C., BARBARA, A., VEENSTRA, G. J., XU, G., KAISER, U. B., LIU, X. S., SUGRUE, S. P., HE, X., MIN, J., KATO, Y. & SHI, Y. G. 2012. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*, 151, 1200-13.
- XUE, Y., PETROVIC, N., CAO, R., LARSSON, O., LIM, S., CHEN, S., FELDMANN, H. M., LIANG, Z., ZHU, Z., NEDERGAARD, J., CANNON, B. & CAO, Y. 2009. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab*, 9, 99-109.
- YAMAMIZU, K., FUJIHARA, M., TACHIBANA, M., KATAYAMA, S., TAKAHASHI, A., HARA, E., IMAI, H., SHINKAI, Y. & YAMASHITA, J. K. 2012. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. *Cell Stem Cell*, 10, 759-70.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., MINOKOSHI, Y., ITO, Y., WAKI, H., UCHIDA, S., YAMASHITA, S., NODA, M., KITA, S., UEKI, K., ETO, K., AKANUMA, Y., FROGUEL, P., FOUFELLE, F., FERRE, P., CARLING, D., KIMURA, S., NAGAI, R., KAHN, B. B. & KADOWAKI, T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8, 1288-95.

YAMAUCHI, T., KAMON, J., WAKI, H., TERAUCHI, Y., KUBOTA, N., HARA, K., MORI, Y., IDE, T., MURAKAMI, K., TSUBOYAMA-KASAOKA, N., EZAKI, O., AKANUMA, Y., GAVRILOVA, O., VINSON, C., REITMAN, M. L., KAGECHIKA, H., SHUDO, K., YODA, M., NAKANO, Y., TOBE, K., NAGAI, R., KIMURA, S., TOMITA, M., FROGUEL, P. & KADOWAKI, T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med*, 7, 941-6.

YAMAUCHI, T., NIO, Y., MAKI, T., KOBAYASHI, M., TAKAZAWA, T., IWABU, M., OKADA-IWABU, M., KAWAMOTO, S., KUBOTA, N., KUBOTA, T., ITO, Y., KAMON, J., TSUCHIDA, A., KUMAGAI, K., KOZONO, H., HADA, Y., OGATA, H., TOKUYAMA, K., TSUNODA, M., IDE, T., MURAKAMI, K., AWAZAWA, M., TAKAMOTO, I., FROGUEL, P., HARA, K., TOBE, K., NAGAI, R., UEKI, K. & KADOWAKI, T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 13, 332-9.

YANG, R. Z., LEE, M. J., HU, H., POLLIN, T. I., RYAN, A. S., NICKLAS, B. J., SNITKER, S., HORENSTEIN, R. B., HULL, K., GOLDBERG, N. H., GOLDBERG, A. P., SHULDINER, A. R., FRIED, S. K. & GONG, D. W. 2006. Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med*, 3, e287.

YIN, W., MU, J. & BIRNBAUM, M. J. 2003. Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 278, 43074-80.

YOKOMORI, N., TAWATA, M. & ONAYA, T. 1999. DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene. *Diabetes*, 48, 685-90.

YOKOMORI, N., TAWATA, M. & ONAYA, T. 2002. DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells. *Diabetologia*, 45, 140-8.

YONESHIRO, T., AITA, S., MATSUSHITA, M., KAYAHARA, T., KAMEYA, T., KAWAI, Y., IWANAGA, T. & SAITO, M. 2013. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest*, 123, 3404-8.

YOO, C. B., JEONG, S., EGGER, G., LIANG, G., PHIASIVONGSA, P., TANG, C., REDKAR, S. & JONES, P. A. 2007. Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. *Cancer Res*, 67, 6400-8.

YOU, M., CONSIDINE, R. V., LEONE, T. C., KELLY, D. P. & CRABB, D. W. 2005. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology*, 42, 568-77.

YUE, P., JIN, H., XU, S., AILLAUD, M., DENG, A. C., AZUMA, J., KUNDU, R. K., REAVEN, G. M., QUERTERMOUS, T. & TSAO, P. S. 2011. Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology*, 152, 59-68.

ZARKESH-ESFAHANI, H., POCKLEY, A. G., WU, Z., HELLEWELL, P. G., WEETMAN, A. P. & ROSS, R. J. 2004. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J Immunol*, 172, 1809-14.

ZENTNER, G. E. & HENIKOFF, S. 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 259-66.

ZHANG, Y., MATHENY, M., ZOLOTUKHIN, S., TUMER, N. & SCARPACE, P. J. 2002. Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta*, 1584, 115-22.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.

ZHU, J. G., XIA, L., JI, C. B., ZHANG, C. M., ZHU, G. Z., SHI, C. M., CHEN, L., QIN, D. N. & GUO, X. R. 2012. Differential DNA methylation status between human preadipocytes and mature adipocytes. *Cell Biochem Biophys*, 63, 1-15.

ZHU, J. K. 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet*, 43, 143-66.

ZHU, S., SUN, F., LI, W., CAO, Y., WANG, C., WANG, Y., LIANG, D., ZHANG, R., ZHANG, S., WANG, H. & CAO, F. 2011. Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem*, 353, 305-13.

ZIMMERMANN, R., STRAUSS, J. G., HAEMMERLE, G., SCHOISWOHL, G., BIRNER-GRUENBERGER, R., RIEDERER, M., LASS, A., NEUBERGER, G., EISENHABER, F., HERMETTER, A. & ZECHNER, R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306, 1383-6.

ZISMAN, A., PERONI, O. D., ABEL, E. D., MICHAEL, M. D., MAUVAIS-JARVIS, F., LOWELL, B. B., WOJTASZEWSKI, J. F., HIRSHMAN, M. F., VIRKAMAKI, A., GOODYEAR, L. J., KAHN, C. R. & KAHN, B. B. 2000. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, 6, 924-8.